

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt
Hämatologie, Onkologie und Tumorimmunologie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

HABILITATIONSSCHRIFT

**Deregulation von Zellzyklus und Apoptose
als molekulare Grundlage der
Therapieresistenz von Tumoren**

zur Erlangung der Venia Legendi
für das Fach Experimentelle Hämatologie, Onkologie und Tumorimmunologie

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Dr. med. Peter Daniel
aus Reutlingen

Präsident: Prof. Dr. rer. nat. J. Mlynek

Dekan: Prof. Dr. med. J. W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. P. H. Krammer, Heidelberg
2. Prof. Dr. D. Hoelzer, Frankfurt a.M.

Datum der Habilitation: 5.11.2002 (eingereicht 8.1.2002)

Widmung

Meinem Vater, Werner Daniel (21.2.1925 - † 12.6.1999)

*Denn wir sind nur die Schale und das Blatt
Der große Tod, den jeder in sich hat,
das ist die Frucht, um die sich alles dreht.*

R.M. Rilke

Inhaltsverzeichnis

WIDMUNG	3
INHALTSVERZEICHNIS.....	4
ZUSAMMENFASSUNG	6
1. EINLEITUNG	7
2. REGULATION DER APOPTOSE.....	8
2.1 Death-Rezeptoren	11
2.2 Mitochondrien und Apoptose.....	12
2.3 Endoplasmatisches Retikulum und Apoptose	15
2.4 Vernetzung der Apoptose-Signalwege	16
2.5 Die Exekution des apoptotischen Zelltods.....	18
3. REGULATION DES ZELLZYKLUS	20
3.1 Zellzyklusregulation und der G1-Restriktionspunkt	22
3.2 Zellzyklus-Hemmung durch die Retinoblastom (Rb) Genfamilie	23
3.3 Zellzyklus-Regulation durch Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen	25
3.4 Inhibitoren der Cyclin-abhängigen Kinasen	27
3.5 G1/S-Transition und S-Progression durch E2F und c-Myc	28
3.6 Vernetzung der Signalwege von Zellzyklus und Apoptose	30
4. SIGNALDEFEKTE ALS PROGNOSTISCHE FAKTOREN	34
Eigene Ergebnisse:.....	37
4.1 Analyse des p53/Bax Signalwegs bei Patienten mit primär reseziertem kolorektalen Karzinom: niedrige Bax-Expression ist ein negativer prognostischer Faktor	37
4.2 Analyse des p53/Bax Signalwegs in kolorektalen Karzinomen: Verlust von Bax ist ein negativer prognostischer Faktor für Patienten mit resezierten Lebermetastasen	38
4.3 Analyse des p53/Bax/p16 Signalwegs beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus: Hohe Expression von Bax und p16 identifiziert Patienten mit guter Prognose.	39
4.4 Mutation von p53 bei B-CLL: Bezug zu Vortherapie mit alkylierender Chemotherapie, Krankheitsprognose und Einfluß auf Zytostatika-induzierten Zelltod	40

4.5	Das Rezidiv der akuten lymphatischen Leukämie des Kindesalters ist mit einem Abfall der Bax/Bcl-2 Ratio und dem Verlust der spontanen Caspase-3 Prozessierung <i>in vivo</i> assoziiert	41
5.	APOPTOSE UND ZYTOTOXISCHE TUMORTHERAPIEN.....	42
	Eigene Ergebnisse.....	44
5.1	Aktivierung von Caspase-8 beim Zytostatika-induzierten Zelltod in B-Lymphomzellen ist unabhängig von CD95 Rezeptor/Ligand Interaktion und erfolgt im Signalweg unterhalb der Caspase-3 Aktivierung	44
5.2	Bax-Expression korreliert mit zellulärer Zytostatika-Sensitivität gegenüber Doxorubicin, Cyclophosphamid und Chlorambucil aber nicht für Fludarabin, Cladribin oder Glukokortikoiden bei B-zellulärer chronischer lymphatischer Leukämie.....	45
5.3	Expression des Zelltodgens Nbk/Bik sensibilisiert Glukokortikoid-resistente T Lymphomzellen für Zytostatika-induzierte Apoptose und hemmt Tumorwachstum in Mäusen mit schwerem kombiniertem Immundefekt (SCID).....	46
5.4	Die Apoptose-fördernden Bcl-2 Homologe Bak und Nbk/Bik überwinden Zytostatika-Resistenz in Mdr-1 negativen und Mdr-1 überexprimierenden Mammakarzinom-Zelllinien.....	46
5.5	Überexpression von Caspase-3 vermittelt Sensitivität für Zytostatika-induzierten Zelltod in Mammakarzinomzellen mit erworbener Zytostatikaresistenz	47
6.	AUSBLICK	48
	DANKSAGUNG	50
	LITERATUR	51
	ANHANG.....	64
	Publikationsverzeichnis	64
	Originalarbeiten.....	64
	Übersichtsarbeiten, Buchbeiträge.....	66
	Kongresspublikationen, Letters to the Editor.....	67
	Eidestattliche Versicherung.....	68

Zusammenfassung

Die Störung von Apoptose-Signalwegen spielt eine zentrale Rolle sowohl bei der Tumorentstehung als auch bei der Entwicklung von Therapieresistenz in malignen Tumoren. Von besonderer Bedeutung für das Ansprechen auf zytotoxische Tumorthérapien sind die Komponenten des mitochondrialen Apoptosesignalwegs und dessen übergeordneten Regulatoren. Durch die Analyse solch zentraler Regulatoren der Apoptose, wie den Mitgliedern der Bcl-2 Genfamilie, des p53- und des Rb-Signalwegs, konnten Patienten mit guter bzw. schlechter Prognose identifiziert werden. Hierbei zeigte sich, dass die kombinierte Analyse von einander nachgeschalteten Signalwegkomponenten, wie z.B. p53 und Bax, der Analyse einzelner Markergene überlegen ist. Solche Signalweganalysen konnten bei akuten und chronischen Leukämien, Kolon-, Ösophagus-, und Mammakarzinomen erfolgreich durchgeführt werden. Neben diesen deskriptiven genetischen Analysen an Tumorproben ermöglichte die funktionelle Manipulation dieser Signalwege die Sensibilisierung von Tumorzellen für Chemo-, Radio- und auch biologische Therapien. Mittels nicht-viraler, retro- und adenoviraler Gentransfervektoren wurden Regulatoren der Apoptose, wie z.B. Apoptose-fördernde Mitglieder der Bcl-2 Genfamilie, das Tumorsuppressorgen p14^{ARF} oder auch Procaspase-3 in Tumorzellen eingebracht, um Resistenzen zu überwinden bzw. um direkt Zelltodsignalwege in den malignen Zellen zu aktivieren. Signalweganalysen sowohl in primärem Tumorgewebe von Patienten als auch in Zelllinienmodellen identifizierten die hierfür notwendigen Komponenten der betreffenden Signalwege. Von besonderem Interesse war hierbei, dass durch die genetische Manipulation von Apoptose- und Zellzyklus-Regulation Signaldefekte in resistenten Tumoren umgangen und überwunden wurden. Dies könnte in Zukunft als mögliche Basis für neue, molekulare Therapieansätze in der Tumorthérapie dienen.

1. Einleitung

Die Regulation von Zellproliferation und Zelltod erfolgt durch eng miteinander verknüpfte Signalwege. In normalen und ausgereiften, adulten, sich aber dennoch ständig selbst erneuernden Geweben besteht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Zellproliferation durch mitotische Teilung und Zelluntergang durch programmierten Zelltod (Apoptose)¹⁻³. Beide Phänomene werden durch komplizierte Regulationssysteme engmaschig kontrolliert^{4,5}. Dies spiegelt sich auch in der Bedeutung dieser beiden zellbiologischen Phänomene bei der Entstehung von benignen⁶ und malignen Tumoren wieder⁷⁻¹².

Tumorentstehung wird somit nicht nur durch die ungehemmte Aktivierung von Zellzyklus-aktivierenden Signalwegen erleichtert, sondern auch durch die Inaktivierung von Zelltodsignalwegen¹³. Beide Ereignisse und die beteiligten Signalwege sind eng miteinander verknüpft und eine onkogene Kooperation zwischen Zellzyklus- und Apoptose-Deregulation konnte z.B. bei der malignen Transformation durch das c-myc und das Bcl-2 Gen in transgenen Mäusen gezeigt werden¹⁴. Überexpression von Bcl-2 im B-Zellkompartiment allein löst im Tiermodell Hyperplasie der B-Zellregionen in den Lymphgeweben aus. Die spontane Aktivierung oder transgene Überexpression des c-myc Gens führte hingegen zu hochmalignen B-Zell-Lymphomen. Ebenso fördert, z.B. das K-Ras Onkogen nicht nur Zellwachstum, sondern hemmt auch Zelltod-Signalwege¹⁵.

Alle malignen Tumore weisen solche Störungen der Proliferations- und der Zelltodkontrolle auf (**Abb. 1**). Maligne Tumore sind häufig genetisch instabil und akkumulieren nach den initialen transformierenden genetischen Ereignissen weitere, sekundäre genetische Veränderungen¹⁶. Dies kann zu einem weiteren Verlust der Proliferationskontrolle und noch stärkerer Apoptose-Resistenz führen. Solche Veränderungen werden im Rahmen der Tumorprogression beobachtet, d.h. bei der Entstehung aggressiverer und Therapie-resistenter Tumore, z.B. im Rahmen einer Chemo- oder Strahlentherapie.

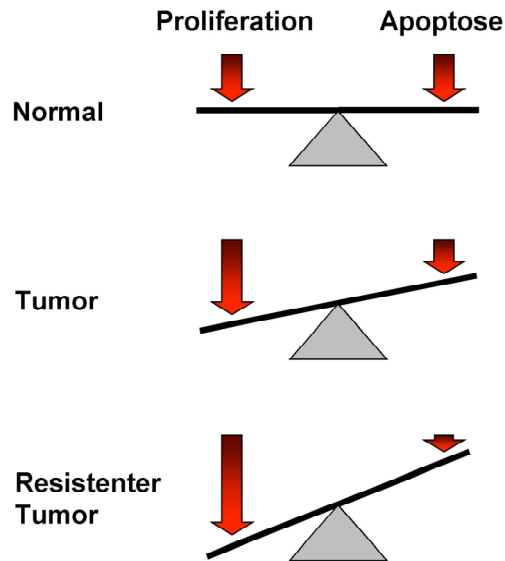


Abb. 1: Balance von Zellvermehrung und Zelluntergang.

In normalem Gewebe herrscht ein Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Zelltod. Unerwünschte Zellen werden durch Apoptose eliminiert. In malignen Tumoren entsteht ein Ungleichgewicht: Zellproliferation nimmt zu und Apoptose ist gehemmt. In der malignen Progression, z.B. durch Entstehung von Resistenz gegen zytotoxische Therapien oder bei Metastasierung, nimmt diese Imbalance weiter zu.

Neuere Daten zeigen, dass die Hemmung von Zelltod zumeist nicht direkt an der eigentlichen malignen Transformation beteiligt ist, sondern nur das Überleben der betroffenen Zellen verlängert, es entsteht ein hyperplastisches Gewebe mit erhöhtem Zellgehalt ¹⁷. Hierdurch wird allerdings die Akkumulation genetischer Veränderungen erleichtert, die dann sekundär zum Verlust der Proliferationskontrolle führen. Beide Phänomene können also nicht isoliert betrachtet werden, und die beteiligten Signalwege sind auf einer Vielzahl von Ebenen engmaschig miteinander verknüpft.

2. Regulation der Apoptose

Programmierter Zelltod, Apoptose, wird durch distinkte Signale und Signalwege reguliert (Abb. 2). Ein diesen Signalwegen gemeinsames Prinzip ist die Ausbildung eines zytosolischen Signaltransduktionskomplexes (DISC; Death-inducing signaling complex), an die sich eine kaskadenartig verstärkende Aktivierung einander nachgeschalteter Apoptose-

fördernder Faktoren anschließt, welche die Aktivierung exekutierender Enzyme, der Caspasen vermitteln¹⁸. Dies ist ein evolutionär konserviertes Prinzip, das zu solch archaischen Organismen wie dem Wurm *Cenorhabditis elegans* und wahrscheinlich noch älteren Organismen wie Schleimpilzen (*Dictyostelium*) und sogar Bakterien zurückverfolgt werden kann^{2,5}.

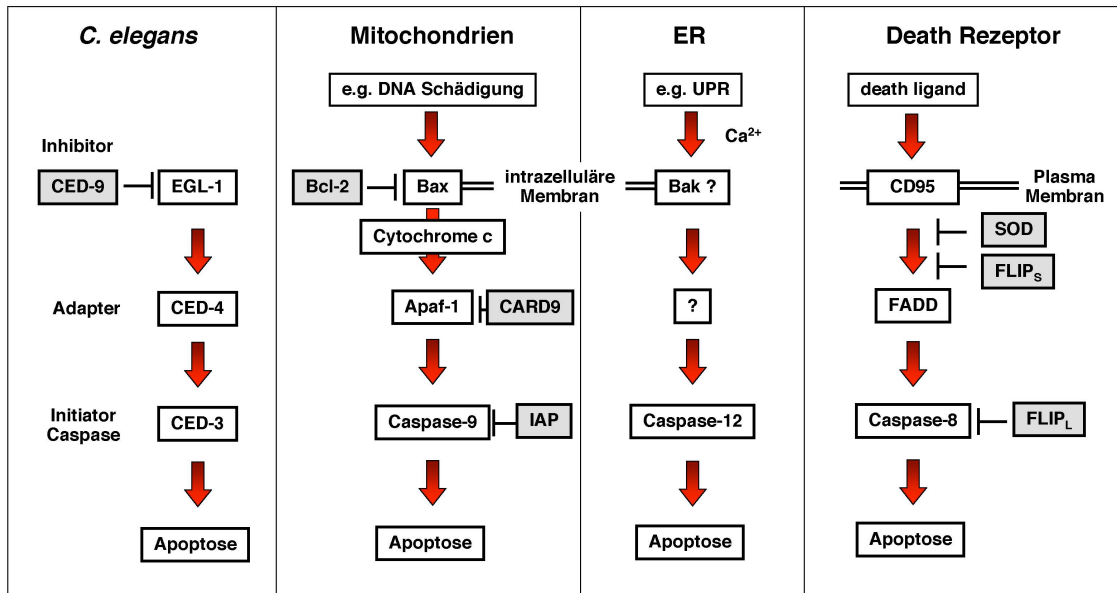


Abb. 2: Apoptose-Signalwege

Das grundlegende Konzept der Aktivierung und Hemmung der Apoptose-Signalkaskade kann evolutionsgeschichtlich bis zu archaischen Organismen wie dem Nematoden *Cenorhabditis elegans* zurückverfolgt werden. Der humane Apoptosehemmer Bcl-2 ist ein Homolog des *C. elegans* ced-9 Gens (*C. elegans* death Gen-9), das Apoptose-fördernde Bax ist ein Homolog von egl-1, APAF-1 enthält eine Domäne mit Homologie zu ced-4 und Caspase-3 ist ein Homolog von ced-3. Die Aktivierung eines Zelltod-Effektors wie Bax führt zur Bildung eines Apoptose-induzierenden Signalkomplexes (Death-inducing signaling complex, DISC) und zur Aktivierung von Initiator-Caspasen. Bak lokalisiert besonders ausgeprägt auch im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und kann dort die Apoptose-Induktion nach ER-Streß vermitteln (z.B. bei Unfolded Protein Response, UPR). Analog hierzu wird bei Aktivierung von Death-Rezeptoren durch die entsprechenden Liganden ein zytoplasmatischer DISC aus z.B. dem Adapterprotein FADD und der Procaspase-8 gebildet. Die Initiator-Caspasen aktivieren Downstream-Caspasen, die den apoptotischen Zelltod exekutieren. Inhibitoren können diese Signalwege auf jeder Ebene inhibieren; auf der Ebene der Aktivatoren (z.B. Bcl-2), der Adapter (z.B. Bcl-2, FLIP, SOD, CARD-9), bzw. auf der Ebene der Caspasen: FLIP_L und IAPs.

CED: *C. elegans* death gene, ER: endoplasmatic reticulum, UPR: unfolded protein response, SOD: silencer of death domain. FLIP_s: short splice variant of Fas-linked inhibitory protein, FLIP_L: long splice variant of FLIP, FADD: Fas-associated death domain, IAP: inhibitor of apoptosis proteins, CARD: caspase-recruitment domain.

Die bisher am besten molekular definierten DISC-Signalwege werden durch Mitochondrien¹⁹ und die Death-Rezeptoren der TNF-Rezeptorsuperfamilie vermittelt^{18,20}. Seit kurzem gibt es Hinweise, dass auch andere Zellkompartimente wie das endoplasmatische Retikulum (ER) über die Aktivierung der Caspase-12 Apoptose induzieren können, z.B. bei Stressreaktionen des ER im Rahmen deregulierter Entleerung des Calcium-Speichers oder massiver Akkumulation pathologischer Proteine (Unfolded Protein Response, UPR) bei Virus-Infektionen oder Amyloid-Protein beim M. Alzheimer^{5,21,22}.

Die Ausbildung und Aktivierung eines DISC resultiert in der raschen Rekrutierung von Inducer-Caspasen (wie der Caspase-2, -8, -9, -10, oder -12). Diese Inducer-Caspasen aktivieren in der Signalkaskade nachgeschaltete Effektor-Caspasen (Caspase-3, -6 und -7), die dann die Apoptose exekutieren und hunderte von regulatorischen Proteinen degradieren, sowie andere Protease-Systeme und Endonukleasen aktivieren^{23,24}. Vergleichbar den Enzymkaskaden der Blutgerinnung oder des Komplementsystems wird durch die Aktivierung der Caspase-Signalkaskade eine lawinenartige Verstärkung des initialen Signals erreicht. Hierdurch wird die irreversible Zerstörung der Zelle eingeleitet. Die Bildung eines DISC wurde erstmals für Death-Rezeptor-vermittelte Apoptose für den CD95/Fas-Rezeptor beschrieben²⁵. Durch Rezeptor-Oligomerisierung durch Bindung des Liganden oder durch agonistische Antikörper erfolgt die Bindung von FADD (Fas associated death domain) Adapterproteinen, die wiederum über ihre DED (Death Effektor Domäne) die Procaspasen-8 bzw. -10 rekrutieren können. SOD-Proteine (Silencer of Death Domain) können die Rekrutierung von FADD hemmen²⁶. Ebenso können FLIP-Proteine die Bindung der Procaspase-8 (kurze und lange Spleissvariante, FLIP_S, FLIP_L) bzw. die Aktivierung der Procaspase-8 hemmen (FLIP_L)²⁷.

Ein vergleichbarer Komplex (nicht homologer) Signalproteine wurde dann für den mitochondrialen Apoptose-Signalweg definiert. Hier wird der DISC von dem zytosolischen Adapterprotein APAF-1 gebildet, das mitochondriale Ko-Faktoren (Cytochrom c und ATP) bindet und hierdurch aktiviert wird²⁸⁻³⁰. Aktiviertes APAF-1 rekrutiert über die nun zugängliche CARD-Domäne die Pro-Caspase-9, die sowohl im Zytosol lokalisiert ist, als auch aus Mitochondrien freigesetzt wird. Dieser Proteinkomplex aus APAF-1, Cytochrom c und Pro-Caspase-9, sowie ATP, stellt den mitochondrialen DISC dar, der auch als mitochondriales Apoptosom bezeichnet wird.

2.1 Death-Rezeptoren

Diese in der Plasmamembran lokalisierten Transmembran-Rezeptoren sind durch ihre Primärstruktur repetitiver Cystein-reicher extrazellulärer Domänen charakterisiert, welche die Trimerisierung dieser Rezeptoren vermitteln und die Bindung der ebenfalls trimeren Liganden ermöglichen. Zusätzlich enthalten sie im intrazellulären Teil eine als Death-Domäne (DD) bezeichnete Aminosäuresequenz, welche die Bindung von signaltransduzierenden Adapterproteinen und die Bildung des DISC vermittelt ^{31,32}. Gegenwärtig sind 6 Death-Rezeptoren bekannt: Der 55 kDa TNF-Rezeptor (TNF-R1), CD95/Fas, die TRAIL-Rezeptoren DR3, 4, und 5, sowie DR6 für den noch kein Ligand identifiziert wurde (**Abb. 3**).

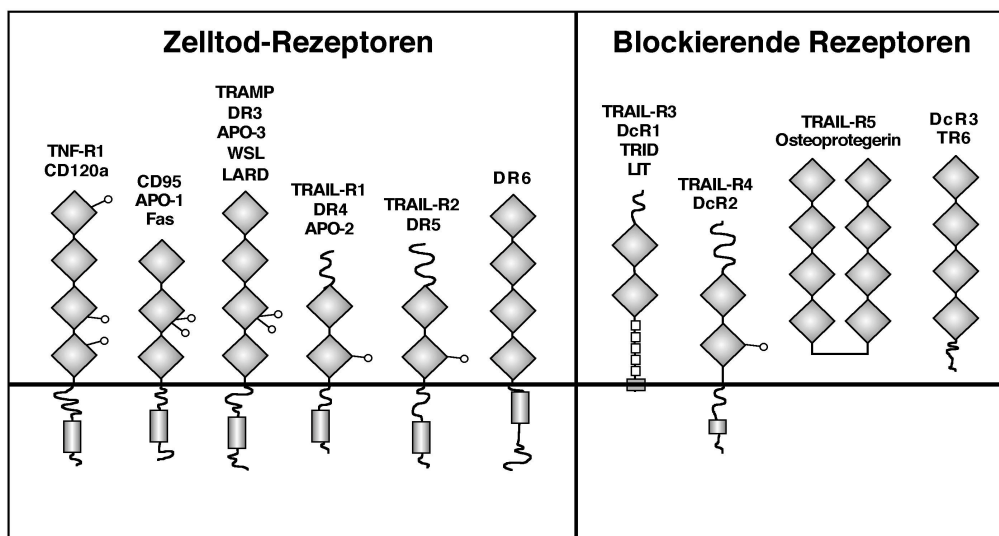


Abb. 3: Schematische Darstellung von Death-Rezeptoren und neutralisierenden Decoy-Rezeptoren.

Mitglieder dieser Untergruppe der TNF-Rezeptor-Superfamilie sind durch ihre intrazelluläre Death-Domäne (DD) charakterisiert, die als graue Box schematisch dargestellt ist. Die 2 bis 4 Boxen im extrazellulären Teil symbolisieren homologe, Cystein-reiche Domänen, die für die Bindung der Death-Liganden und Trimerisierung der Rezeptoren verantwortlich sind. Den TRAIL Decoy-Rezeptoren DcR1 und DcR2 fehlt die intrazelluläre Domäne bzw. sie enthalten nur eine trunkierte, funktionell inaktive DD. Osteoprotegerin (OPG) und DcR3 werden sezerniert und sind lösliche, nicht membranständige Moleküle. Angegeben sind die jeweiligen gebräuchlichen Bezeichnungen und deren Synonyme für die verschiedenen Death- und Decoy-Rezeptoren.

Sogenannte Decoy-Rezeptoren können Liganden der Death-Rezeptoren binden und sequestrieren, da es sich entweder um lösliche Moleküle oder Rezeptoren ohne funktionelle zytoplasmatische Death Domänen handelt ^{20,33}. Die biologische Funktion der Decoy-Rezeptoren für die Apoptose-Regulation, vor allem in vivo und für experimentelle Tumorthérapien mit Death-Liganden, wie z.B. TRAIL, ist jedoch noch völlig ungeklärt, insbesondere die Frage, ob hierdurch Resistenzen gegenüber diesen Apoptose-induzierenden Liganden ausgelöst werden können.

Die Bindung der entsprechenden Liganden (CD95/Fas Ligand ³⁴, TNF (Tumor Nekrose Faktor) oder TRAIL ³⁵ (TNF-related apoptosis inducing ligand) vermittelt die Trimerisierung der Death-Rezeptoren ³⁶ und erhöht die lokale Konzentration der Rezeptoren am Ort der Liganden-Bindung. Hierdurch wird auch die Rekrutierung der Adapterproteine FADD zur DD des Rezeptor-Oligomers vermittelt ²⁵ (**Abb. 2** und **Abb. 4**; FADD, Fas associated death domain; sowohl im TNF-R1 als auch CD95/Fas-Signalweg) bzw. RIP und RAIDD im TNF-R1 Signalweg) ^{5,20}. Die geclusterten Rezeptoren rekrutieren über diese Adapterproteine Inducer-/Initiator-Procaspasen, die hierdurch zu den aktiven heterotetrameren Caspasen gespalten und prozessiert werden. Caspase-8 ist die dominante Rezeptor-aktivierte Caspase und wird z.B. von den TRAIL-Rezeptoren (DR3, 4 und 5), CD95/Fas und TNF-R1 aktiviert ³⁷. Die der Caspase-8 nahe verwandte Caspase-10 wirkt vorwiegend sowohl im TRAIL- als auch im CD95/Fas-Rezeptorweg und kann Caspase-8 funktionell komplementieren ³⁸. Der TNF-R1 kann die Pro-Caspase-2 über die RAIDD und RIP Adapterproteine rekrutieren ^{39,40}. Der Mechanismus der proteolytischen Aktivierung dieser Inducer-Caspasen ist nach wie vor unklar, erfolgt aber wahrscheinlich, wie im Falle der Pro-Caspase-9, autokatalytisch in den multimeren DISC-Komplexen ²⁰.

2.2 Mitochondrien und Apoptose

Die Aktivierung des mitochondrialen Apoptose-Signalwegs (**Abb. 4**) wird von Bcl-2, Bcl-xL und andere Apoptose-hemmende Mitglieder der Bcl-2-Genfamilie kontrolliert und gehemmt ⁴¹. Im Gegensatz hierzu vermögen Apoptose-fördernde Mitglieder dieser Genfamilie, wie z.B. Bax ⁴², Bak ^{43,44} und Bok ⁴⁵, direkt Mitochondrien zu aktivieren. Der Verlust der Bax-Expression ist in den meisten Tumoren mit der Resistenz gegen zytotoxische Therapiemodalitäten verbunden ⁴⁶⁻⁵⁰. Der Apoptose-regulierende Mechanismus der Bcl-2 Familienmitglieder ist, obwohl Bcl-2 als eines der ersten Gene in dieser Signalkaskade identifiziert wurde, immer noch nicht vollständig klar. Als gesichert gilt, dass Bax und dessen

Homologe Bak und Bok direkt Mitochondrien aktivieren können, die daraufhin Cytochrom c und ATP aus dem Raum zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran freisetzen ⁵¹. Dieser Vorgang kann durch Bcl-2 gehemmt werden ⁵².

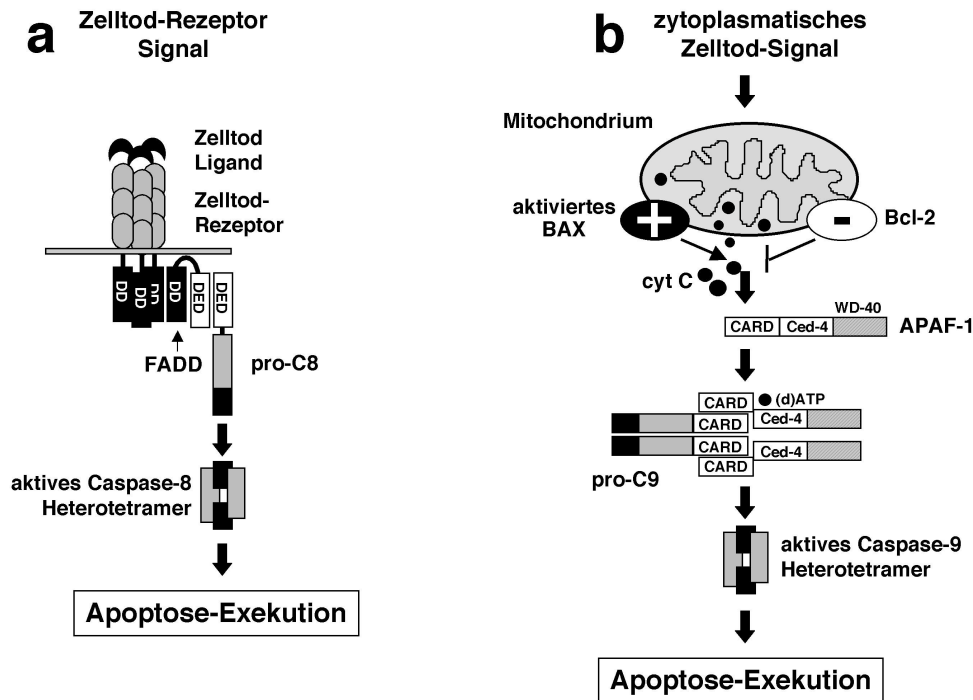


Abb. 4: Aktivierung des mitochondrialen und des Death-Rezeptor-vermittelten Apoptose-Signalwegs.

a. Aktivierung von Death-Rezeptoren führt zur Bildung eines DISC. Im Fall des CD95/Fas Rezeptors führt die Bindung des trimeren Fas Liganden an ein Rezeptor-Trimer zur DISC-Bildung: das FADD Adapterprotein wird über die Death-Domänen in CD95 und FADD rekrutiert. Dies stimuliert die Bindung von Pro-Caspase-8 (C8) über die Death-Effektor Domäne (DED) in pro-C8, wodurch die Aktivierung von pro-C8 zur aktiven C8 induziert wird.

b. Der mitochondriale Apoptose-Signalweg kann über die Aktivierung von p53, z.B. nach DNA-Schädigung, aktiviert werden. Über Bax wird die Freisetzung von Cytochrom c induziert. Dies führt zur Aktivierung des APAF-1 Adapterproteins, wodurch die Rekrutierung von pro-C9 in den Komplex ausgelöst wird. Pro-C9 wird autokatalytisch aktiviert und die Effektor-Caspase-Signalkaskade aktiviert.

DD: Death Domäne, DED: Death Effektor-Domäne, DISC: Death-Inducing Signaling Complex, FADD: Fas-assoziierte Death Domäne.

Die Aktivierung der Mitochondrien kann hierbei in distinkte Aktivierungsschritte unterteilt werden: (1) Die Konformationsänderung im N-Terminus von Bax löst die Translokation vom

Zytoplasma und Insertion in die äußere Mitochondrienmembran aus. (2) Dies führt als ein sehr frühes Ereignis zur Öffnung von Kanälen und Freisetzung von ATP und Cytochrom c. (3) Die Atmungskette als Energielieferant bleibt aktiv. (4) Erst später kommt es durch den Einstrom zytosolischer Ionen und H₂O zum Zusammenbrechen des mitochondrialen Membranpotentials, der mitochondrialen Permeabilitäts-Transition ($\Delta\psi_m$) mit Anschwellen der Mitochondrien und Platzen der äußeren und später auch der inneren Membran und letztlich (5) dem Zusammenbrechen der Atmungskette^{19,53,54}. Es ist nach wie vor nicht völlig geklärt, wie diese Kanäle gebildet werden. Sowohl für Bcl-2 als auch Bax konnte gezeigt werden, dass diese Proteine nicht nur über die BH-Domänen (**Bcl-2 Homologie**) dimerisieren, sondern auch oligomerisieren können, um selbst Kanäle zu bilden⁵⁵. Neben dieser Kanalbildung regulieren Bcl-2 und Bax aber auch spannungsabhängige mitochondriale Kanäle⁵⁶, die in der äußeren Membran durch das VDAC-Protein⁵⁷ (Voltage Dependent Anion Channel) und in der inneren Membran durch das ANT-Protein (Adenin-Nukleotid Transporter) gebildet werden^{54,58}. Die Aktivität dieser Kanäle kann durch den peripheren Benzodiazepin-Rezeptor, der auch in der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert ist, moduliert werden.

Das nun zytosolische Cytochrom c bindet an APAF-1, und zwar an dessen WD40-Domäne⁵⁹. Gemeinsam mit der Bindung von ATP bzw. dATP an die CED4-Homologiedomäne von APAF-1 wird hierdurch eine Konformationsänderung in APAF-1 ausgelöst, wodurch die CARD-Domäne (**Caspase-Rekrutierungs-Domäne**) exponiert wird^{60,61}. Dies ermöglicht die Bindung der Procaspase-9 an die APAF-1 CARD-Domäne. Die WD40-Domäne vermittelt auch die Dimerisierung von APAF-1⁶², wodurch mindestens 2 Procaspase-9 Proteine in engen räumlichen Kontakt gelangen und sich autokatalytisch zum biologisch aktiven Caspase-9 Heterotetramer spalten⁶³. Neuere Daten lassen vermuten, dass dieses mitochondriale Apoptosom durch weitere CARD-enthaltende Proteine zu großen multimeren Proteinkomplexen assoziiert. Dies erleichtert die Aktivierung der Initiator-Caspase. Die aktive Caspase-9 kann durch limitierte Proteolyse die Effektor-Caspasen-3, -6 und -7 aktivieren und hierdurch die Exekution der Apoptose einleiten²⁴.

Neben Cytochrom c werden noch weitere Proteine aus den apoptotischen Mitochondrien freigesetzt, unter anderem (1) AIF (Apoptosis Inducing Factor)^{64,65}, der hohe Homologie zu bakteriellen Flavoproteinen aufweist, in den Zellkern transloziert und dort eine Caspase-unabhängige DNA-Fragmentierung in hochmolekulare Fragmente auslöst. Die Morphologie des AIF-induzierten Zelltods ähnelt jedoch mehr der Nekrose. Der Beitrag dieses Faktors zum apoptotischen Zelltod ist allerdings nach wie vor nicht völlig geklärt. (2) SMAC/DIABLO⁶⁶,

das die Aktivität der anti-apoptotischen IAPs (s.u.) hemmt und hierdurch die Exekution der Apoptose verstärkt ⁶⁷⁻⁷⁰ und (3) HSP10, das anti-apoptotische Funktion hat und die Aktivierung der Procaspase-9 hemmen kann ⁷¹.

Die Apoptose-hemmende Wirkung von Bcl-2 ist Gegenstand aktueller Diskussionen. Bis vor kurzem wurde die hemmende Wirkung von Bcl-2 im Apoptosom lokalisiert. Grundlage hierfür war, dass eine direkte Bindung von Bcl-xL über dessen Bcl-2-Homologie-Domäne Nr. 4 (BH4) an Ced-4, das *C. elegans* Homolog von APAF-1 demonstriert wurde ^{62,72}. Diese Interaktion ist jedoch physikalisch sehr schwach und mittlerweile konnte durch zellbiologische Untersuchungen gezeigt werden, dass Bcl-2 die Apoptose-fördernde Wirkung von APAF-1 nicht zu blockieren vermag und doch nicht an APAF-1 bindet ⁷³⁻⁷⁶. Als wahrscheinlichstes Modell wird daher zur Zeit favorisiert, dass Bcl-2, Bcl-xL und deren funktionelle Apoptose-hemmenden Homologen die Wirkung der Apoptose-Promotoren Bax, Bak und Bok inhibieren. Dieser Effekt wird über die physikalische Interaktion über die Bcl-2 Homologie-Domänen BH1, BH2, vor allem aber auch über die BH3 vermittelt. APAF-1 hingegen wirkt nachgeschaltet und übt seine Caspase-aktivierende Funktion erst nach Freisetzung des Cytochrom c aus.

Die Unterfamilie der BH3-only Proteine der Bcl-2 Genfamilie ⁴¹ reguliert den Vorgang der Aktivierung des mitochondrialen Signalwegs., indem sie Apoptose-hemmende Proteine wie Bcl-xL und Bcl-2 aus der Bindung an Bax verdrängen können und hierdurch Bax (oder auch Bak) aktivieren. Solche Wirkungen wurden mittlerweile für Bad, Bim und Bid gezeigt. Diese BH3-only Proteine agieren wahrscheinlich als Bindeglieder zwischen spezifischen Signalkaskaden und der mitochondrialen Apoptose-Signalkaskade.

2.3 Endoplasmatisches Retikulum und Apoptose

Ein erst vor kurzem entdeckter Mechanismus der Apoptose wird über das endoplasmatische Retikulum (ER) aktiviert (**Abb. 2**), z.B. durch eine ER-Stressantwort wie der UPR (Unfolded Protein Response), die z.B. nach Hemmung des Proteinexports aus dem ER beobachtet wird. Dieser Signalweg wird durch die Procaspase-12 vermittelt, die spezifisch mit dem ER assoziiert ist. Caspase-12 wird spezifisch durch ER-Stress-Signale aktiviert, wie z.B. Störungen der Calcium-Homöostase im ER oder Akkumulation missgefalteter Proteine im ER. Die Aktivierung dieses Signalwegs ist unabhängig von Death-Rezeptor-Signalen und der mitochondrialen Apoptose-Signalkaskade. Tunicamycin aktiviert diese Signalkaskade

ebenfalls, da es die Proteinglykosylierung im Golgi-Apparat blockiert und zur Proteinretention im ER und einer UPR führt. Ebenso lösen kombinierte Hypoxie und Glukose-Entzug eine ER Stressantwort mit Induktion der ER-Chaperone Bip/grp78 und grp94 und Aktivierung der Caspase-12 aus. Dieser Mechanismus ist wahrscheinlich auch auslösend für den neuronalen Zelltod in Folge der Akkumulation von Amyloidproteinen, z.B. beim M. Alzheimer.

Interessanterweise ist die ER-induzierte Apoptose durch Bcl-2 hemmbar. Dieses Protein lokalisiert nicht nur in die Mitochondrienmembran, sondern auch in die äußere ER-Membran, wo sich auch die Procaspase-12 befindet. Die molekularen Aktivatoren dieser Stressantwort sind noch unbekannt, obwohl hier wahrscheinlich das Bax-Homolog Bak funktionell relevant ist, da es auch am ER lokalisiert sein kann.

Möglicherweise können Zelltodsignalwege auch durch andere Organellen oder funktionelle Strukturen der Zelle aktiviert werden. Einige Hinweise deuten darauf hin, dass z.B. DNA-Schädigung über Komponenten des DNA-Reparatursystems nukleäre Apoptose aktiviert ⁷⁷.

2.4 Vernetzung der Apoptose-Signalwege

Analog zur multiplen Verknüpfung von Zellzyklus und Apoptose bzw. von DNA-Reparatur und Apoptose sind die verschiedenen Komponenten der Apoptose-Signalwege funktionell miteinander verwebt. Eine Vielzahl verschiedener Signale und Apoptose-Signalwege führt zur Aktivierung der mitochondrialen Apoptose-Signalkaskade über die Aktivierung der Bax-Homologe Bax ⁴², Bak ^{43,44} und Bok/Mtd ^{45,78}. Eine besondere Stellung nehmen hierbei die BH3-only Proteine der Bcl-2 Genfamilie ein. Sie enthalten lediglich die BH3-Domäne und sehr unterschiedliche Prodomänen, die, wie neuere Daten zeigen, über Phosphorylierung die Funktion dieser Proteine regulieren können. Zum Teil sind diese Proteine gewebespezifisch exprimiert und wahrscheinlich an der Regulation Gewebe- und Zelltyp-spezifischer Mechanismen beteiligt.

Das BH3-only Protein Bad ⁷⁹ ist ein Bindeglied zum PI3- und dem Akt/PKB-Kinase-Signalweg ⁸⁰⁻⁸² und dem Ras-Signalweg ⁸³⁻⁸⁵. Es interagiert mit Bcl-xL und inaktiviert es hierdurch funktionell. Bad wird über die PI3/Akt-Kinasekaskade phosphoryliert und inaktiviert ^{86,87}. Hierdurch kann Bcl-xL aus der Bindung an Bad befreit werden und den mitochondrialen Apoptose-Signalweg hemmen ⁸⁸.

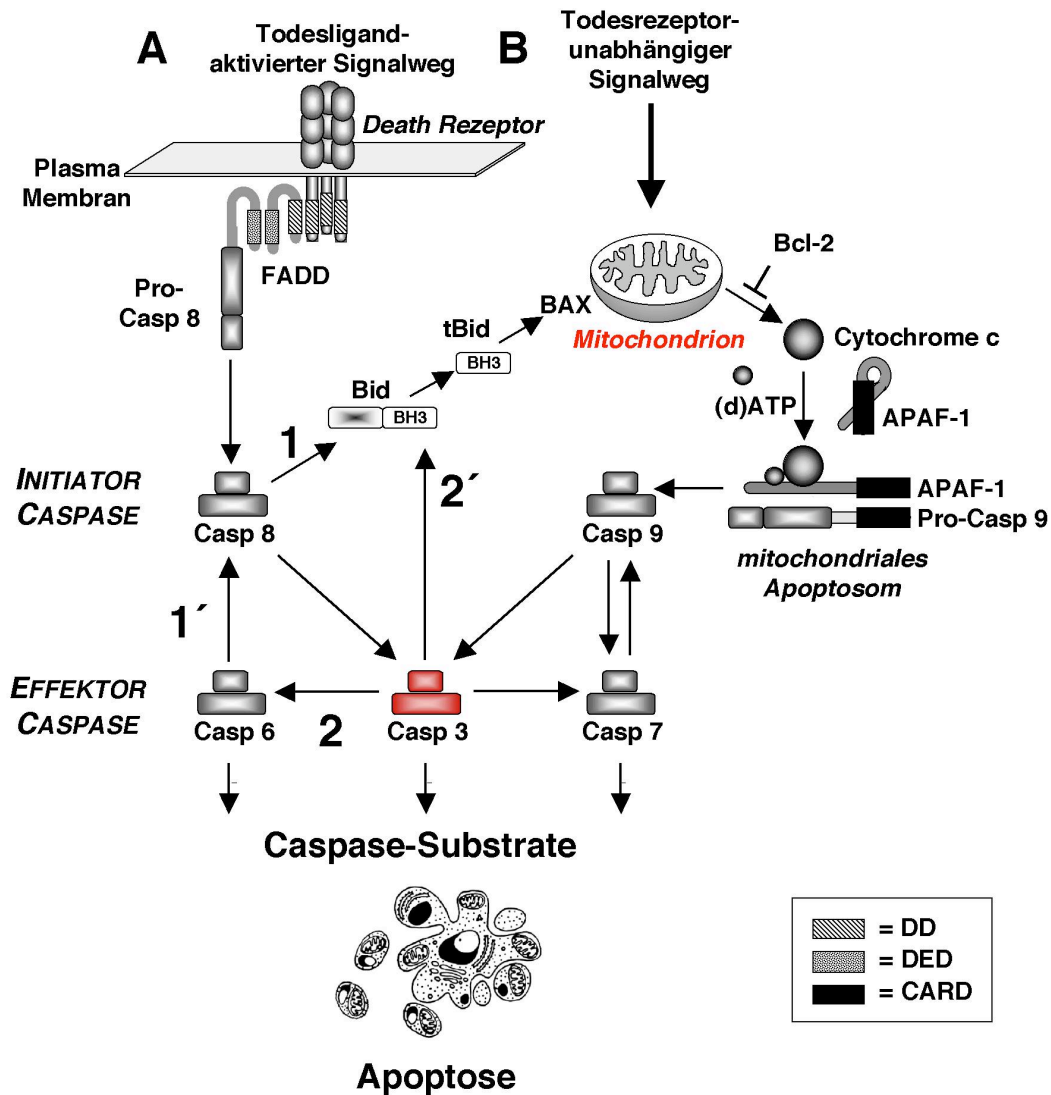


Abb. 5: Vernetzung und Amplifikationsschleifen von Apoptose-Signalwegen.

a. Ein wichtiger Signalweg (linker Teil der Abbildung) wird durch Death-Liganden (z.B. CD95 Ligand, CD95L, FasL) aktiviert. Durch Bindung des Liganden wird ein membranständiger Signalkomplex (DISC) gebildet, der aus CD95L, CD95 Rezeptor, dem Adapterprotein FADD und der Initiator-Caspase Procaspase-8 besteht, die hierdurch aktiviert wird. Caspase-8 wiederum spaltet und aktiviert die Effektor-Caspase-3. Dieser Signalweg kann amplifiziert werden durch (1) Caspase-8-vermittelte Spaltung von Bid bzw. (1') durch die Caspase-6-vermittelte Spaltung von Caspase-8, die beide den Caspase-8-Signalweg mit dem mitochondrialen Apoptosom (mitochondrialer DISC) verknüpfen.

b. Ein weiterer, Rezeptor-unabhängiger Signalweg (rechter Teil der Abbildung) wird durch eine Vielzahl verschiedener Stimuli aktiviert, wie z.B. Zytostatika, Bestrahlung, fehlgeschlagene DNA-Reparatur, Ceramid. Die Aktivierung des Mitochondriums über Bax und dessen Homologen führt zur Bildung und Öffnung von Kanälen, die Cytochrom c freisetzen und den Ausstrom von Ionen, vor allem auch H^+ , ermöglichen und hierdurch den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials bewirken. Cytochrom c und (d)ATP binden an das zytosolische APAF-1, das daraufhin die Procaspase-9 rekrutiert und hierdurch das mitochondriale Apoptosom bildet. Die Initiator-Caspase Procaspase-9 spaltet sich autokatalytisch und die aktive Caspase-9 wiederum spaltet und aktiviert die Effektor-

Caspasen-3, -6, und -7. Dieser Signalweg kann entweder durch die Caspase-6-vermittelte Spaltung von Caspase-8 (2) oder die Caspase-3-vermittelte Spaltung von Bid (2') amplifiziert werden. DD: Death Domäne, DED: Death Effektor Domäne, CARD: Caspase Rekrutierungs-Domäne. Durch derartige Vernetzungen wird eine Amplifikation der Apoptose-Exekution erreicht. Weiterhin wird das System hierdurch redundant und mögliche singuläre Signaldefekte können überspielt werden.

Bim⁸⁹ wiederum koppelt den Motor-Dynein-Komplex an den mitochondrialen Zelltodsignalweg⁹⁰ und ist an der Regulation der immunologischen Homoöstate und Verhinderung von Autoimmunität^{91,92} sowie neuronaler Apoptose⁹³ beteiligt. Das BH3-only Protein BMF wiederum wird durch den Aktin-Myosin-Motor Komplex reguliert⁹⁴. Noxa⁹⁵, Puma^{96,97} und wahrscheinlich auch Hrk^{98,99} sind hingegen an der p53-vermittelten Apoptose beteiligt. Weiterhin werden neue Mitglieder der Familie der BH3-only Proteine identifiziert.

Bid¹⁰⁰ verbindet Death-Rezeptor-vermittelte Apoptose-Signalwege mit dem mitochondrialen Signalweg. Bid nimmt hierbei eine besondere Stellung ein, da es über einen Caspase-8-abhängigen Mechanismus zu tBid (trunkiertes Bid) gespalten werden kann¹⁰¹. Das trunkierte Bid kann mit Bax interagieren und Bax hierdurch aktivieren und dessen Umverteilung vom Zytoplasma in die äußere Mitochondrienmembran induzieren¹⁰² (**Abb. 5**). Analog hierzu kann Bid nach Spaltung durch die Caspase-3 über einen positiven Rückkopplungsmechanismus die mitochondriale Apoptose-Signalkaskade amplifizieren¹⁰³.

BH3-only Proteine wirken also pro-apoptotisch, indem sie in Bax und dessen Homologen eine Konformationsänderung auslösen und hierdurch Mitochondrien-Aktivierung und Freisetzung von Cytochrom c vermitteln^{104,105}. Ob dies ein direkter Effekt auf Bax-Homologe ist oder durch Sequestrierung von Apoptose-hemmenden Bcl-2-Homologen erfolgt (wie im Falle von Bad) ist im Detail noch ungeklärt.

2.5 Die Exekution des apoptotischen Zelltods

Die Effektor-Caspasen aktivieren weitere Proteasen wie die Calpaine. Hierdurch werden eine Vielzahl regulatorischer und struktureller Proteine inaktiviert, die für die Aufrechterhaltung der Integrität und das Überleben der Zelle von Bedeutung sind. Insbesondere werden Zytoskelett, Kernmembran, und andere Strukturproteine zerstört. Caspasen aktivieren durch die proteolytische Spaltung auch anti-apoptotische Proteine zu pro-apoptotischen Faktoren^{23,24,106}. Caspase-3 kann Bcl-2 und Bcl-xL zu Molekülen mit Bax-ähnlicher Wirkung aktivieren¹⁰⁷. Inhibitoren von Endonucleasen, z.B. DFF45/ICAD werden gespalten und die CAD-

Endonuklease wird zur aktiven DNase¹⁰⁸⁻¹¹⁰. Diese DNasen fragmentieren die genomische DNA in oligonukleosomale, etwa 180 Basenpaare oder deren Vielfaches messende DNA-Fragmente, die sich im Agarosegel als sogenannte DNA-Leiter nachweisen lassen^{111,112}. Die Zerstörung der Kernmembran und die Aktivierung von Chromatin-spaltenden DNasen führt zur Kondensation des nukleären Chromatins und Bildung von Mikronuklei, wie sie z.B. auch in mit ionisierender Strahlung exponierten Zellen nachgewiesen werden können. Die Zerstörung des Zytoskeletts führt zur Bildung apoptotischer Körperchen durch Abschnürung von Zellanteilen, die auch Mikronuklei enthalten können. Dieser Vorgang wird auch als Zeiose oder Blebbing bezeichnet. In der Spätphase der Apoptose kommt es zur Depletion des ATP-Pools und hierdurch zur Inaktivierung von ATP-abhängigen Pumpen. Dies führt zur Vakuolisierung von Organellen, Mitochondrien und ER schwellen an.

Apoptose ist ein aktiver, Energie-abhängiger Mechanismus. Ist der Energiestoffwechsel der apoptotischen Zelle völlig zusammengebrochen, dann geht demzufolge die typische apoptotische Morphologie der Zelle in eine Nekrose-Morphologie über. Im Gegensatz zur Nekrose bleibt bei Apoptose jedoch initial die Plasmamembran erhalten. Allerdings wird die Lipidzusammensetzung verändert. Sphingomyeline werden gespalten, und pro-apoptogene Ceramide gebildet, die die Apoptose weiter amplifizieren. Phosphatidylseringruppen, die normalerweise durch eine ATP-abhängige Flipase zur Innenseite der Membran sortiert werden, sind vermehrt auf der Aussenseite der Zelle lokalisiert und machen sie hierdurch als apoptotische Zelle kenntlich¹¹³. Die von innen heraus degradierte Zelle kann nun von umliegenden Phagozyten wie z.B. Gewebsmakrophagen eliminiert werden^{114,115}. Dieser Vorgang erfolgt *in vivo* sehr rasch, so dass Apoptose im intakten Gewebsverband extrem schwierig nachzuweisen ist. Dies erklärt auch, warum Apoptose als zellbiologischer Mechanismus erst sehr spät erkannt und definiert wurde¹. Allerdings kann Apoptose je nach Zell- und Gewebstyp sehr unterschiedlich exekutiert werden und auch die Morphologie ist somit nicht einheitlich. Selbst Charakteristika wie Chromatin-Kondensation und oligonukleosomale DNA-Fragmentierung sind nicht obligat. Zudem ist mittlerweile klar, dass es fließende Übergänge zwischen Apoptose und Nekrose geben kann, z.B. beim Zelltod, der durch TNF ausgelöst wird^{116,117}. Besser ist daher, bei aktiv ausgelöstem Zelltod von programmiertem Zelltod zu sprechen.

3. Regulation des Zellzyklus

Zellwachstum entsteht durch Progression der Zelle durch den Zellzyklus¹¹⁸, der sich aus 4 definierten, voneinander abgrenzbaren Phasen zusammensetzt: G1, S, G2 und M-Phase. Das Fortschreiten einer Zelle aus der G0-Ruhephase in die G1-Phase (Gap-Phase 1) des Zellzyklus und aus der G1-Phase in die S-Phase wird durch den G1-Restriktionspunkt in der späten G1-Phase reguliert^{119,120} (**Abb. 6**). Ist dieser Kontrollmechanismus durch physiologische Stimuli wie z.B. Wachstumsfaktoren (s.u.) oder Deregulation von Kontrollgenen (in Tumorzellen) aufgehoben, geht die Zelle in die S-Phase über und beginnt mit der DNA-Synthese. Ist die S-Phase abgeschlossen, dann gelangt die Zelle nach Durchlaufen der G2-Phase, in der die Segregation der replizierten DNA vorbereitet wird, in die M-Phase, die Mitose. Die Zellteilung wird im Anschluss beendet und die aus der Mitose hervorgegangenen Tochterzellen befinden sich nun wieder in der G1-Phase¹²¹⁻¹²³.

Wesentliche Erkenntnisse zur Regulation der Proliferation wurden in Hefezellen gewonnen, vor allem der Bierhefe *Saccharomyces cerevisiae* und der Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe*¹²⁴⁻¹²⁷. Defektmutanten führten zur Entdeckung der Cycline als Motor des Zellzyklus. Die Expression dieser Proteine oszilliert und zu bestimmten Phasen des Zellzyklus werden bestimmte Cycline hoch- oder herunterreguliert¹²³. Die Cycline¹²⁸ regulieren die Enzymaktivität Cyclin-abhängiger Kinasen^{120,129,130} (CDK, s.u.), die über die Phosphorylierung von Substratproteinen das Fortschreiten der Zelle im Zellzyklus koordinieren und regulieren.

Zudem regulieren weitere Gene die Aktivität dieser Kinasen und ermöglichen hierdurch die Kontrolle des Fortschreitens der Zelle durch die Phasen des Zellzyklus. Dies erfolgt an bestimmten Zeitpunkten, die bestimmte Schlüsselsignale erfordern um ein Fortschreiten im Zellzyklus zu ermöglichen und daher als Check- oder auch Restriktionspunkte bezeichnet werden^{128,131}. Im engeren Sinne sind Checkpunkte „Mechanismen, die eine Abhängigkeit zwischen zwei ansonsten biochemisch nicht miteinander vernetzten Regelwerken herstellen“. Die einzelnen Abschnitte des Zellzyklus setzen sich aus einer ganzen Reihe solcher in festgelegter Folge und zeitlich aufeinander abgestimmter Prozesse zusammen, die letztlich zur Teilung der Zelle in zwei Tochterzellen führen. Hierbei ist die exakte Verdopplung und Verteilung des Genoms in die beiden Tochterzellen zu fordern, um genetische Stabilität zu gewährleisten. Solche Checkpunkte, die mittlerweile in jeder Zellzyklusphase bekannt sind, gestatten das Fortschreiten der Zelle im Zyklus nur dann, wenn bestimmte

zu Zellzyklusarrest und Reparatur oder programmiertem Zelltod, Apoptose, führen¹³²⁻¹³⁶.

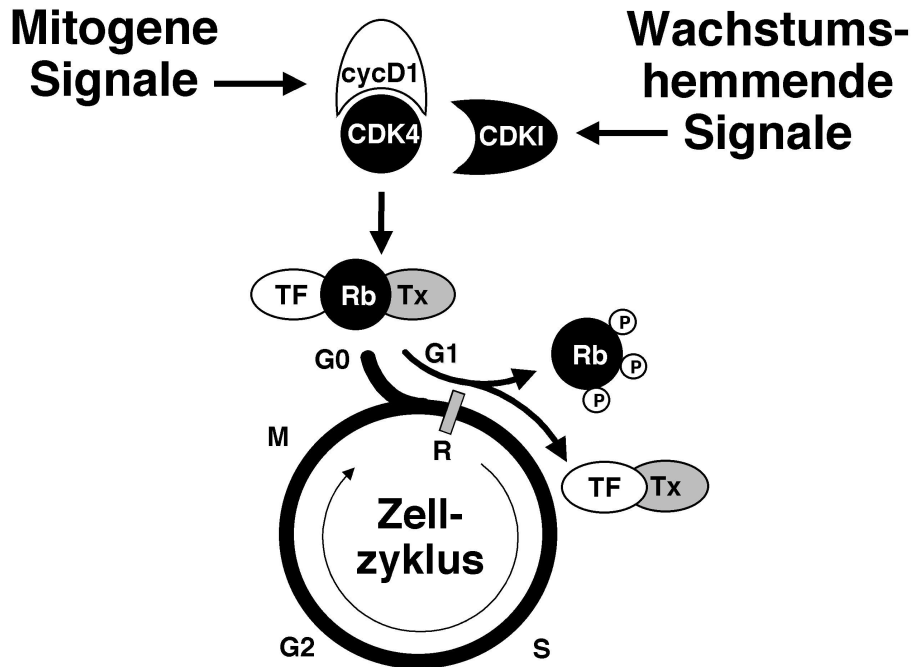


Abb. 6: Zellzyklus, mitogene und wachstumshemmende Signale.

Wachstumsfördernde, mitogene Signale lösen den Eintritt ruhender Zellen aus der G0- in die G1-Phase und aus der G1- in die S-Phase aus. Wesentlich ist die Steigerung der Cyclin-Expression, die als Ko-Faktoren Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) aktivieren. Wachstumshehmende Signale wirken z.B. über Steigerung der Expression von CDK Inhibitoren (CDKI). Aktive Cyclin/CDK Komplexe phosphorylieren Mitglieder der Rb-Proteinfamilie, die daraufhin ihren hemmenden Einfluß auf Transkriptionsfaktoren (TF) verlieren. Diese Transkriptionsfaktoren sind zumeist Heterodimere aus TF und Dimerisierungspartnern (Tx), die erst die DNA-Bindung und Promotoraktivierung ermöglichen (z.B. E2F- und Dp-Proteine, Myc und Max, c-Fos und c-Jun). Diese TF induzieren die Expression von Genen, die den Eintritt in die nächste Zellzyklusphase vermitteln. CDKIs vermitteln Zellzyklusarrest.

Checkpoint-Kontrolle muß also vor allem dann stattfinden, wenn ein nachgeschalteter Vorgang auch ohne den korrekten Abschluß des vorigen Prozesses beginnen und hierdurch der Zelle irreparablen Schaden zufügen könnte. Diese Regelwerke sind in malignen Tumoren häufig gestört, was sich in der Aneuploidie und dem häufig komplexen Karyotyp verschiedenster Tumorzellen in Folge genetischer und chromosomaler Instabilität widerspiegelt^{131,137-143}.

3.1 Zellzyklusregulation und der G1-Restriktionspunkt

Mitogene, also wachstumsstimulierende Signale vermitteln den Eintritt der Zelle aus der G0-Ruhephase in die G1-Phase und aus der G1- in die Synthese-Phase (S-Phase), indem sie die Transkription der G1-Phasen Cycline (D-Typ Cycline und Cyclin E) ^{123,128,139} auslösen und die entsprechenden Cyclin-abhängigen Kinasen aktivieren ^{122,132,144}. Wachstumshemmende Signale hingegen stimulieren Transkription und Aktivität von Inhibitoren der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKI, s.u.) ^{120,145} und aktivieren hierdurch Checkpunkte wie den G1-Restriktionspunkt (**Abb. 6**).

Die Progression von Säugerzellen aus der G1 in die S-Phase ist durch spezifische Veränderungen im Genexpressionsprofil gekennzeichnet ^{137,144}. Die ersten induzierten Gene sind sogenannte Immediate-Early Gene, deren Transkription wenige Minuten nach mitogener Stimulation beginnt und ihr Maximum innerhalb der ersten 30 bis 60 Minuten erreicht. Immediate-Early Gene sind zumeist Transkriptionsfaktoren, wie z.B. die c-fos und c-jun Protoonkogene, die den AP-1 Faktor bilden. Ihre Transkription, also mRNA-Expression kann nicht durch Hemmer der Proteinbiosynthese wie z.B. Cycloheximid blockiert werden, ist durch präformierte, konstitutiv exprimierte Proteine der entsprechenden Signaltransduktions-Kaskaden vermittelt (Immediate) und erfolgt daher früh nach Aktivierung (Early). Eine zweite Klasse von Genen, die Delayed-Early Gene, wird nach 3 bis 6 Stunden nach mitogener Stimulation exprimiert und wird durch die Immediate-Early Transkriptionsfaktoren vermittelt. Zu diesen Delayed-Early Genen gehören die G1-Cycline (Cyclin D, Cyclin E) und auch E2-F und c-myc. Eine dritte Gengruppe wird erst spät in der G1-Phase exprimiert und diese Gene sind Vorboten der G1/S-Phasen Progression, also des Übergangs von der G1- in die S-Phase. Die Expression dieser Gene wird durch c-myc und Mitglieder der E2F-Familie stimuliert (s.u.) bzw. durch hypophosphorylierte Rb-Familienmitglieder gehemmt.

Neben dem G1-Restriktionspunkt sind zusätzliche Checkpunkte aktiv, die den Fortschritt der Zelle durch jede der Phasen des Zellzyklus kontrollieren ^{137,146,147}. Zellen sind während des Zellzyklus sehr empfindlich und können wesentlich leichter irreversibel und letal geschädigt werden. Diese Checkpunkte werden z.B. durch ionisierende Bestrahlung oder DNA-Schädigung durch Zytostatika aktiviert, wodurch die Zelle nicht nur in der G1-Phase, sondern auch in der S-, vor allem aber auch in der G2- und den einzelnen Schritten der M-Phase arretiert werden kann, um die entstandenen Schäden zu reparieren. Die Progression der Zelle durch den Zellzyklus wird durch den Rb-Signalweg kontrolliert.

3.2 Zellzyklus-Hemmung durch die Retinoblastom (Rb) Genfamilie

Die Rb-Familie besteht aus den funktionell und strukturell nahe verwandten Genen pRb, p107 und p130^{132,145,148-152}. Die Inaktivierung beider pRb Allele, vorwiegend durch Keimbahn-Mutationen, ist mit der Entstehung von Retinoblastomen assoziiert. Diese malignen Tumore der Netzhaut treten im frühen Kindesalter auf. Das Spektrum somatischer und hereditärer Keimbahn-Mutationen ist durch Mutation kleiner Genabschnitte geprägt, die sich durch erhebliche Heterogenität auszeichnen und über das gesamte Rb-Gen verteilt gefunden werden. Einige der Mutationen betreffen das Spleißen der mRNA oder führen prämatüre Stop-Codons ein und resultieren in der Expression trunkierter, verkürzter und somit funktionsdefekter Proteine bzw. hemmen vollständig die Protein-Expression. Mit wenigen Ausnahmen entwickeln die von solchen Mutationen betroffenen Kinder bilaterale, beide Augen betreffende Netzhauttumore. Neben diesen familiär, schon im frühen Kindesalter auftretenden Tumoren wird eine Inaktivierung von Rb infolge somatischer Mutationen oder Deletion des Genlokus in einer Vielzahl von Tumoren, auch beim Erwachsenen, beobachtet.

Die wachstumskontrollierende Funktion von Rb-Proteinen beruht auf ihrer Fähigkeit, reversibel an Transkriptionsfaktoren wie z.B. E2F (s.u.) zu binden¹⁴⁰. Das Rb-Protein (pRb) ist ein transkriptioneller Repressor, der durch die Interaktion mit diesen E2F-Transkriptionsfaktoren spezifisch die Promotoraktivierung Zellzyklus-regulierender Gene hemmt. Wird pRb durch die Bindung an E2F an einen Promotor gebunden, dann hemmt es ebenfalls umgebende Transkriptionsfaktoren und blockiert hierdurch die Transkriptionsmaschinerie für das betroffene Gen. Hierdurch wird die Transkription Zellzyklus-promovierender Gene gehemmt und die Zelle wird im Zellzyklus (in diesem Fall in der G1-Phase) arretiert.

Die Bindungstasche in pRb (Pocket-Domäne) für diese Transkriptionsfaktoren prägte den Begriff „Pocketproteine“, der häufig synonym für die Rb-Proteinfamilie gebraucht wird¹⁴⁸. Die A- und die B-Domäne in pRb und seinen Homologen p107 und p130 sind evolutionär konserviert und bilden das Repressormotiv der Bindungstasche, über das die Bindung an E2F und der dominant negative Effekt auf die Transkription von S-Phase-Proteinen vermittelt wird.

Die Bindung von pRb an E2F wird durch den Phosphorylierungsstatus von pRb reguliert (s.u.)^{150,151}. In seiner hypophosphorylierten Form inhibiert pRb Transkriptionsfaktoren der

E2F/DP Familie und verhindert hierdurch die Hochregulation von Genen, die z.B. für die Aktivierung der DNA-Synthese während der S-Phase benötigt werden. Um im Zellzyklus fortschreiten zu können, muss daher pRb phosphoryliert und hierdurch funktionell inaktiviert werden.

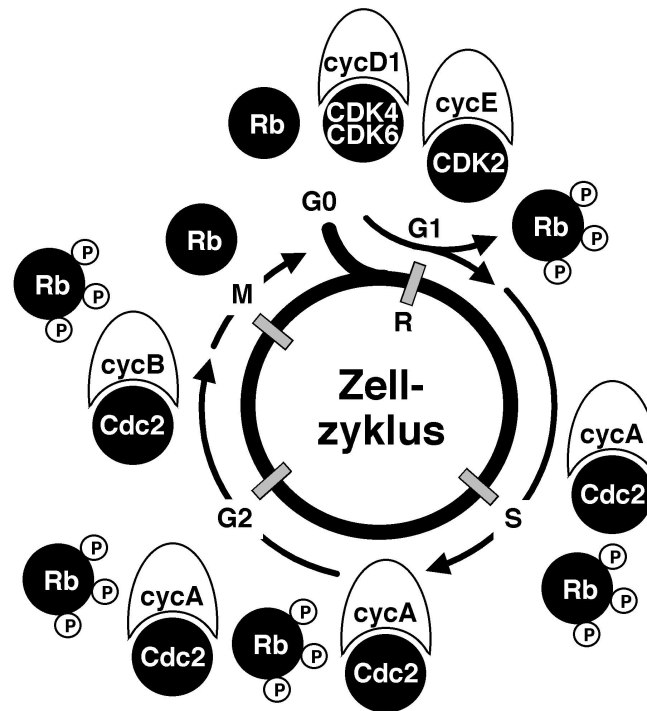


Abb. 7: Regulation der Rb-Phosphorylierung.

In der G1-Phase werden Rb-Proteine in 2 Schritten phosphoryliert: in der frühen G1 Phase durch Cyclin D1, D2 oder D3 und CDK4 oder CDK6. In der späten G1-Phase vermittelt der Cyclin E/CDK2-Komplex den zweiten Phosphorylierungsschritt und löst hierdurch S-Phase-Progression aus. Die CDK Cdc2 (CDK1) erhält Rb über die S-Phase (CDK Ko-Faktor Cyclin A) und die G2-Phase (CDK Ko-Faktor Cyclin B) hinweg im hyperphosphorylierten Zustand. Mit Eintritt in die M-Phase wird Cyclin B herunterreguliert und abgebaut, so dass Rb dann über die Rb-Phosphatase PP1 und auch indirekt über die PTEN Phosphatase dephosphoryliert werden kann und die Tochterzellen erneut in der G1-Phase sind, bis der nächste Zellzyklus aktiviert wird. Rb kann auch hypophosphoryliert werden, indem CDKs durch den Abbau von Cyclin/CDK-Komplexen über das Proteasom inaktiviert werden, wie z.B. durch den APC-Komplex, der die Ubiquitinylierung und den Abbau von B-Typ-Cyclinen auslöst.

Das nun mehrfach phosphorylierte pRb kann nicht mehr mit E2F-Faktoren interagieren, die nun mit den Dimerisierungspartnern der DP-Familie ¹⁵³, Dp1-1 und Dp1-2, in Wechselwirkung treten und hierdurch biologisch aktive, Transkriptionsfaktoren bilden ^{140,151}. Vergleichbares gilt für die Interaktion von Myc-Proteinen mit dem Dimerisierungspartner

Max¹⁵⁴⁻¹⁵⁶. Die aus der Bindung an Dp-Proteine resultierende Aktivierung von E2F und Aktivierung entsprechender S-Phase-spezifischer Gen-Promotoren löst die G1/S Transition aus und aktiviert die Transkription von Genen, wie z.B. Histonen, PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), Thymidylatsynthase, Dihydrofolatreduktase und Ribonucleotidreduktase^{157,158}. Hierdurch wird die Transition der Zelle aus der späten G1-Phase in die S-Phase ermöglicht (s.u.)¹⁴⁰.

Diese Rb-Phosphorylierung wird durch Cyclin-abhängige Kinasen (Cyclin-dependent kinases, CDK) vermittelt^{122,130}. Die Aktivität dieser Kinasen wird durch spezifische Ko-Faktoren, die Cycline, reguliert, deren Expression in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus rasch ansteigt und ebenso rasch gegen Ende der jeweiligen Zellzyklusphase wieder abfällt, also oszilliert.

Die Rolle von Rb in den späteren Zellzyklusphasen ist weniger gut definiert^{132,150-152}. Sicher ist, dass Rb in der G2/M-Phase dephosphoryliert wird. Auch in der S-Phase wurde eine hemmende Wirkung von (dephosphoryliertem) Rb auf die DNA-Synthese beschrieben. Rb bleibt daher über die S- und G2-Phase phosphoryliert, bis es dann gegen Ende der Mitose dephosphoryliert wird, und die Zelle hierdurch erneut in der G1-Phase arretiert ist (**Abb. 7**). Rb-Dephosphorylierung erfolgt unter anderem durch die PP1 Proteinphosphatase¹⁵⁰. Auch für die PTEN-Phosphatase wurde eine, allerdings indirekte Wirkung auf die pRb-Phosphorylierung beschrieben. Überexpression des PTEN Tumorsuppressorgens kann Proliferation von Tumorzellen hemmen und geht mit einer Dephosphorylierung von pRb einher. Dieser Effekt wird über die PI3- und Akt-Kinase vermittelt.

3.3 Zellzyklus-Regulation durch Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen

Der Übergang von einer in die nächste Phase des Zellzyklus wird durch Cyclin-abhängige Kinasen (Cyclin Dependent Kinases, CDK) reguliert. Diese Enzyme bilden einen Komplex mit jeweils spezifischen Ko-Faktoren, den Cyclinen. Die aktiven Cyclin/CDK-Komplexe phosphorylieren Substratproteine, z.B. die Pocketproteine der Rb-Familie (**Abb. 7**). Cyclin/CDK-Komplexe regulieren hierdurch die entscheidenden Kontrollpunkte des Zellzyklus (**Abb. 8**).

Werden ruhende Zellen durch Wachstumsfaktoren stimuliert, dann erfolgt die Regulation der initialen Schritte der Zellvermehrung und der Eintritt in die S-Phase durch D-Typ Cycline (Cyclin D1, D2 und D3) und ihre katalytischen Partner CDK4 und CDK6^{119,139}. Solche

proliferationsaktivierenden Signale, z.B. über die Ras-Aktivierung und die MAP-Kinase Kaskade^{141,159} oder NF- κ B-Aktivierung, stimulieren die Expression von Cyclin D1¹⁶⁰ bzw. dessen beiden Homologen Cyclin D2 und D3. Die neu gebildeten Cycline binden an CDK4 und CDK6, wodurch deren Kinase-Aktivität angeschaltet wird. Diese Cyclin-CDK Komplexe vermitteln dann die Phosphorylierung von pRb.

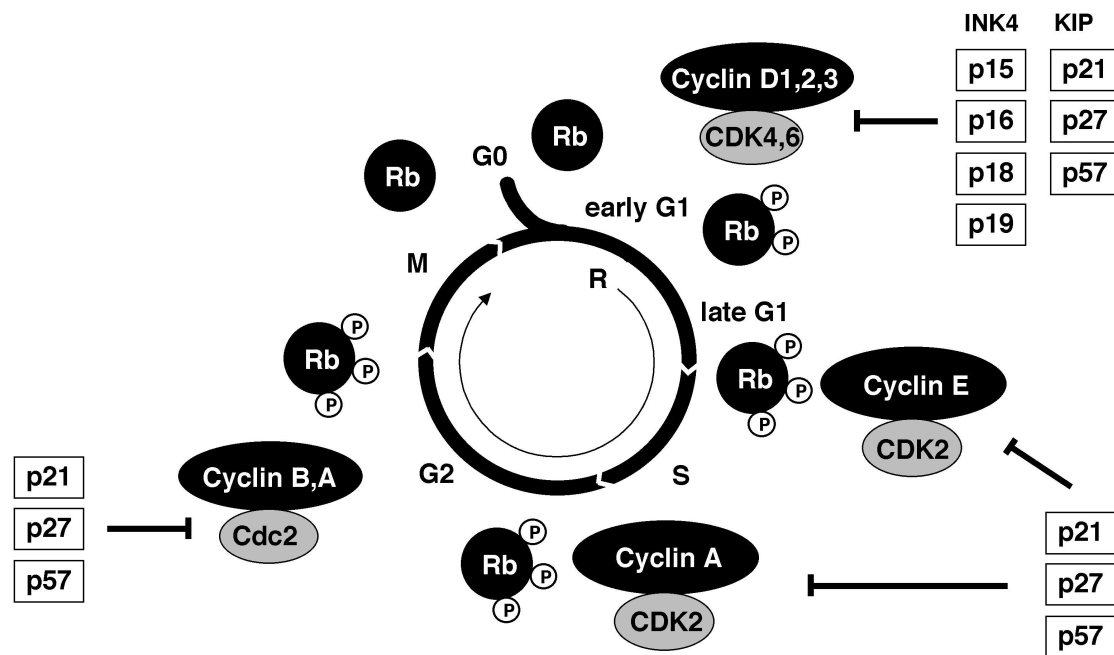


Abb. 8: Regulation der Zellzyklusphasen durch Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen (CDK).

In jeder der Zellzyklusphasen sind spezifische Cycline exprimiert, die mit spezifischen CDKs interagieren und sie hierdurch aktivieren. Diese CDK phosphorylieren Rb und ermöglichen den Fortschritt der Zelle durch den Zellzyklus bis Rb gegen Ende des Zellzyklus durch Phosphatasen dephosphoryliert wird und die aus der Mitose hervorgegangenen Tochterzellen nach Ende der M-Phase erneut in der G1-Phase sind. CDKIs können diese Cyclin/CDK Komplexe in jeder Zellzyklusphase hemmen und Zellzyklusarrest auslösen. Die CDKIs der INK4a-Familie hemmen G1-Phase Cycline während die CDKIs der KIP-Familie auch S- und G2-Phase Cyclin/CDK-Komplexe hemmen.

Dieses Prinzip der Aktivierung einer CDK durch ein spezifisches Cyclin findet sich in allen Zellzyklusphasen. So interagiert in der frühen G1 Phase Cyclin D mit CDK4 und CDK6, gefolgt von Cyclin E/CDK2 in der späten G1 Phase, Cyclin A/CDK2 in der S-Phase, Cyclin A/Cdc2 (CDK1) in der späten S-Phase und dem S/G2 Übergang, sowie Cyclin B/Cdc2

(CDK1) in der G2-Phase und dem G2/M Übergang (**Abb. 7 und 8**). Während in epithelialen Zellen vorwiegend D1-Cyclin funktionell relevant ist, sind in hämatopoetischen Zellen besonders D2- und D3-Cyclin exprimiert^{161,162}. Eine Ausnahme ist das Mantelzell-Lymphom, das aufgrund der für diese Erkrankung typischen t(11;14) Translokation Cyclin D1 überexprimiert¹⁶³⁻¹⁶⁶.

Die D-Typ Cycline (Cyclin D1, D2, D3) kontrollieren gemeinsam mit Cyclin E¹⁶⁷ den G1 Restriktionspunkt (**Abb. 7 und 8**). Rb wird durch diese D-Cycline und die assoziierten Kinasen CDK4/6 phosphoryliert, wodurch es zur Hochregulation von Cyclin E kommt, das durch Aktivierung von CDK2 einen zweiten Rb-Phosphorylierungsschritt in der späten G1-Phase auslöst^{145,167}.

Die CDKs zeigen im Verlauf des Zellzyklus eine relativ lange Halbwertszeit. Im Gegensatz hierzu oszillieren die Expressionsspiegel der Cycline in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus, und die Phasen-spezifischen Cycline werden rasch beim Übergang in die nächste Phase des Zellzyklus nach Export aus dem Zellkern in das Zytoplasma ubiquitinyliert und über das Proteasom abgebaut, begleitet vom Anstieg des Expressionsniveaus des nächsten Cyclins^{140,168}. Demzufolge führt die Herunterregulation der Cyclin B Spiegel am Ende der G2- und Beginn der M-Phase zur Hypophosphorylierung von Rb und ermöglicht somit, im Zusammenspiel mit dem APC/Mad-Signalweg und Deaktivierung des Anaphase-Checkpunkts, das Ende des Zellzyklus nach Abschluss der Mitose¹⁶⁹.

3.4 Inhibitoren der Cyclin-abhängigen Kinasen

Die Aktivität der CDKs wird durch spezifische Inhibitoren negativ reguliert. Diese Inhibitoren werden als CDKI bezeichnet (Cyclin-dependent kinase inhibitors). Bisher konnten 2 Unterfamilien der CDKIs identifiziert werden: (1) die CIP/KIP Familie, die multiple verschiedene Cyclin/CDK-Komplexe hemmen kann und (2) die INK4-Familie, die spezifisch CDK4 und CDK6 hemmt (**Abb. 8**).

Die Aktivität von CDK2 (assoziiert mit Cyclin E) kann durch Cip/Kip CDKI Proteine gehemmt werden (p21^{Waf1/Cip1}, p27^{Kip1} und p57^{Kip2}). Diese Cip/Kip-Faktoren verfügen über eine konservierte, homologe Domäne, die die Bindung und Hemmung von CDK2 und CDK4 vermittelt. Diese Proteine wirken stöchiometrisch und hemmen bevorzugt CDK2-Komplexe, obwohl sie *in vitro* mit allen in der G1-Phase gebildeten CDK-Komplexen interagieren können.

Die INK4-Familie (**In**hibiert **CDK4**) besteht aus 4 nahe verwandten Faktoren: p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} und p14^{INK4d} (p19^{INK4d} in der Maus) ¹⁴². Die INK4 Familienmitglieder verhindern die Progression aus der G1-Phase in die S-Phase des Zyklus, indem sie die Phosphorylierung von Rb verhindern. Dies erfolgt durch Hemmung der D-Cyclin-abhängigen CDK4 und CDK6. Das somit hypophosphorylierte Rb hemmt wiederum die Aktivität von Transkriptionsfaktoren (z.B. E2F) und verhindert hierdurch die Expression von Cyclin E und weiteren für die S-Phase-Progression benötigten Faktoren (**Abb. 8**). Dies erklärt auch, warum INK4 CDKIs für ihre Wirkung Rb benötigen.

3.5 G1/S-Transition und S-Progression durch E2F und c-Myc

Die E2F-Familie von Transkriptionsfaktoren besteht aus 6 Mitgliedern (E2F-1 bis -6) ^{140,170}. Zur Bildung des aktiven Transkriptionsfaktors wird jedoch, wie auch bei anderen Transkriptionsfaktoren, wie z.B. c-myc, c-fos/c-jun oder NF- κ B, ein Dimerisierungspartner benötigt: die DP1-Proteine (**Abb. 9**) ^{153,171}. Die Rb-Familienmitglieder assoziieren in unterschiedlicher Affinität mit diesen E2F-Faktoren ^{132,151}. PRb bindet hauptsächlich E2F-1 bis -4, wohingegen p130 und p107 bevorzugt an E2F-4 und -5 binden. Hypophosphorylierung von Rb führt zur Freisetzung und Aktivierung der E2F-Faktoren. Transkriptionelle Zielgene von E2F sind weitere Zellzyklus-regulierende Gene (Cyclin E, Cyclin A, Cdc2, der CDKI p21, das proto-Onkogen c-myc) und Faktoren, die im DNA-Metabolismus eine Rolle spielen (Dihydrofolatreduktase, Thymidinkinase, Thymidylatsynthase, etc.) ¹⁷². Hierdurch wird die G1/S-Progression ausgelöst, also der Übergang aus der späten G1- in die S-Phase. Die Akkumulation von D-Cyclinen während der G1-Phase sequestriert zudem CDK2-Inhibitoren der Cip/Kip-Genfamilie, wodurch die Wirkung von E2F-abhängigen Regulationsschritten, z.B. vermittelt durch Cyclin E/CDK2 verstärkt und die G1/S-Transition erleichtert wird.

Myc-Proteine sind Transkriptionsfaktoren, deren Aktivität durch Dimerisierung mit gewebespezifischen Ko-Faktoren vermittelt wird ^{173,174}. Für die Regulation hämatopoetischer Zellen und deren maligne Transformation ist vor allem das c-myc-Gen entscheidend ^{175,176}. Über ein Leucin-Zipper-Motiv dimerisiert c-Myc mit dem im Überschuß vorliegenden Max Protein und bildet hierdurch das DNA-bindende Myc/Max Heterodimer, das die Transkription S-Phase-spezifischer Gene induziert ¹⁷⁷, hierdurch die S-Phase unterhält und weiter vorantreibt ^{154-156,178}. Wie auch E2F wird c-myc Aktivierung durch Bindung an unphosphoryliertes Rb gehemmt ^{151,152,171}. C-myc Expression wird unter anderem von E2F-

Transkriptionsfaktoren induziert und amplifiziert die G1/S-Phasen-Transition durch transkriptionelle Aktivierung von S-Phase-Genen, aber auch der Cyclin E Expression^{140,171}.

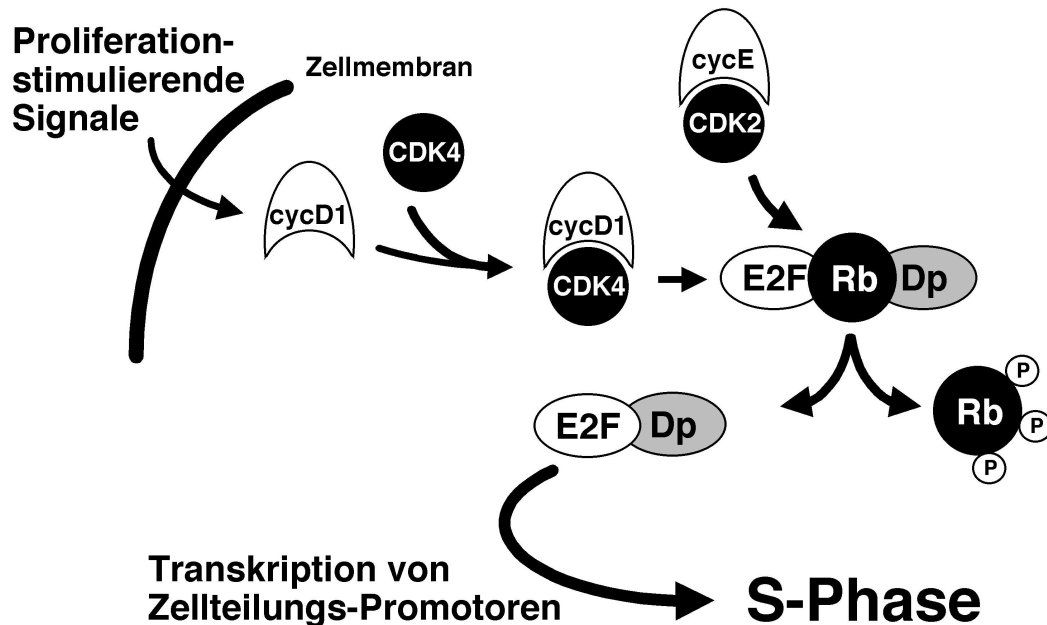


Abb. 9: Regulation der S-Phase Progression durch E2F.

Nach mitogener Stimulation werden Rb-Proteine in 2 Schritten phosphoryliert. Der erste Phosphorylierungsschritt wird durch D-Cycline und CDK4 und CDK6 vermittelt. Der zweite Phosphorylierungsschritt erfolgt durch den Cyclin E/CDK2-Komplex. Das nun mehrfach phosphorylierte Rb kann Transkriptionsfaktoren wie E2F nicht mehr inhibieren und die nun freien E2F/Dp Heterodimere können Promotoraktivierung vermitteln und Gene aktivieren, die S-Phase Progression auslösen (S-Phase-Promotoren).

Die Expression von c-myc ist bei einer Vielzahl maligner Tumore dereguliert^{175,178}. Dies kann durch Genamplifikation oder, wie im Falle der hochmalignen Burkitt-Lymphome, bevorzugt in Folge einer t(8;14) Translokation erfolgen, die das c-myc Gen unter die Kontrolle des Schwereketten-Enhancers bringen und zu deregulierter Expression führen¹⁷⁸. Eine weitere Ursache für erhöhte c-myc Aktivität sind Punktmutationen, die die Bindung des p107 Rb Proteins inaktivieren. Ähnlich wie bei E2F genügt die Überexpression von c-myc allein, um Zellen in die S-Phase zu treiben.

Liegen keine adäquaten Aktivierungsbedingungen vor, dann lösen E2F und c-myc nicht G1/S-Phasen Transition, sondern Apoptose aus^{172,179}. Ein Fortschreiten im Zellzyklus erfordert, dass gleichzeitig Zelltod-hemmende Signale aktiviert werden, z.B. durch Hemmung

des mitochondrialen Apoptose-Signalwegs^{180,181}. Dieses Prinzip der gleichzeitigen Aktivierung von Zelltodsignalwegen schützt vor ungehemmter Zellproliferation und zwar vor allem dann, wenn neben dem mitogenen, Zellzyklus-aktivierenden Signal, entsprechende Zelltod-hemmende Ko-Signale fehlen. Wie im Fall von E2F kann die deregulierte Aktivierung von c-myc also Apoptose auslösen, wenn nicht gleichzeitig die Apoptose-Signalkaskade gehemmt wird, z.B. durch hohe Expression des Apoptose-hemmenden Bcl-2 oder Bcl-xL oder Inaktivierung des p53-Signalwegs, z.B. durch p53-Mutation, p14^{ARF}-Verlust oder Mdm-2 Überexpression^{182,183}. Auch die Deregulation des Ras-Signalwegs (s.u.)¹⁵ kann solche anti-apoptotischen Ko-Signale vermitteln. Eine Reihe von Untersuchungen zeigte, dass die c-myc-induzierte Apoptose über einen p14^{ARF} und p53-abhängigen Mechanismus vermittelt wird (s.u.)^{182,184}.

3.6 Vernetzung der Signalwege von Zellzyklus und Apoptose

Signale, die den Progress von Zellen im Zellzyklus auslösen, aktivieren immer auch Zelltodsignale. Nur durch die Koordination mit Überlebens-Signalen bzw. bei Vorliegen von Zellzyklus-arretierenden Signalen kann die normale Zelle bzw. die Tumorzelle überleben³.

Hierdurch wird verständlich, warum die Überexpression von Zellzyklus-stimulierenden Transkriptionsfaktoren wie E2F-1 und dessen Homologen^{185,186} oder c-myc¹⁷⁹ oder auch von Cyclin D1¹⁸⁷ Apoptose auslöst. Werden hingegen gleichzeitig Überlebenssignale wie z.B. durch Bcl-2 oder Bcl-xL oder andere Apoptose-Hemmer vermittelt, dann überlebt die Zelle das Proliferationssignal¹⁸¹, geht nicht in die Apoptose und schreitet im Zellzyklus fort^{180,188}. Möglicherweise soll durch die gleichzeitige Aktivierung von Proliferations- und Zelltodsignalen die akzidentelle Aktivierung der Zellproliferation vermieden werden. Solche fehlerhaft proliferierenden Zellen würden dann über Apoptose absterben. Dies erklärt zum Teil, warum Tumoren häufig Inaktivierungen von Zelltodsignalwegen aufweisen.

Ebenso kann die Aktivierung von Zelltodsignalen im Zellzyklus gehemmt werden, indem die Zelle in der jeweiligen Zellzyklusphase zum adäquaten Zeitpunkt arretiert wird. Zellzyklusinhibitoren wie die CDKs, vor allem p21^{Cip/Waf}, können daher anti-apoptotische Wirkung zeigen¹⁸⁹. Allerdings kann auch die kontinuierliche Arretierung von Zellen im Zellzyklus in Phasen außerhalb der G0/G1-Phase Zelltodsignalwege aktivieren. Hierdurch wird garantiert, dass nur solche Zellen überleben, die den Zellzyklus korrekt durchlaufen haben. Dies erklärt, warum langanhaltender Zellzyklus-Arrest an verschiedenen

Checkpunkten Apoptose-Programme aktiviert¹³⁴. Dies gilt insbesondere für Zellen in denen gleichzeitig Proliferations-aktivierende und Zellzyklus-arretierende Signale aktiv sind, also divergierende, konkurrierende Signalwege aktiviert wurden. Dies könnte erklären, warum für alle CDKIs (vor allem p16^{190,191}, p21¹⁹² und p27¹⁹³) nach adenoviralem Gentransfer (der gleichzeitig auch die DNA-Replikationsmaschinerie der S-Phase aktiviert) eine Zelltod-fördernde Wirkung gezeigt werden konnte.

Neben den o.g. Genen, die vor allem die Kontrolle des G1-Restriktionspunkts und Zelltod vermitteln, existieren Apoptose-kontrollierende Checkpunkte auch in anderen Phasen des Zellzyklus¹⁹⁴⁻¹⁹⁸. Für die S-Phase ist bekannt, dass Zellen in dieser Phase am empfindlichsten für DNA-Schädigung sind¹⁹⁹. Allerdings gibt es bisher kaum gesicherte Daten dafür, dass Zellen direkt aus dieser Phase heraus in die Apoptose gehen. Vielmehr führt die Mehrzahl der genotoxischen Noxen zur Aktivierung von Checkpunkten und Arretierung der Zelle in der G2 bzw. der M-Phase, die häufig als G2/M-Restriktionspunkt zusammengefaßt werden^{200,201}. Neuere Daten, erneut aus dem experimentellen System in der Hefe, haben einzelne Signalkomponenten identifiziert und einen raschen Wissensfortschritt in den letzten Jahren ermöglicht (**Abb. 10**).

Der S-Phase-Checkpunkt und die regulierenden Faktoren stehen in engem funktionellem Zusammenhang mit dem G2-Checkpunkt. Für beide Checkpunkte wird häufig synonym der Begriff DNA-Schädigungs-Checkpunkt verwendet. Hierbei handelt es sich aber um einen funktionell definierten Begriff, der nicht völlig kongruent mit den individuellen Zellzyklus-Checkpunkten ist, da DNA-Schädigung Checkpunkte in allen Zellzyklusphasen aktivieren kann.

Die ATM und DNA-PK Proteinkinasen, die bei DNA-Schädigung im Rahmen der DNA-Reparatur-Mechanismen aktiviert werden, können über Phosphorylierung von Chk2 und die G2-Restriktionspunkt-Kontrolle Zellzyklusarrest^{202,203} und, über p53-abhängige und -unabhängige Signalwege, Zelltod auslösen^{204,205}.

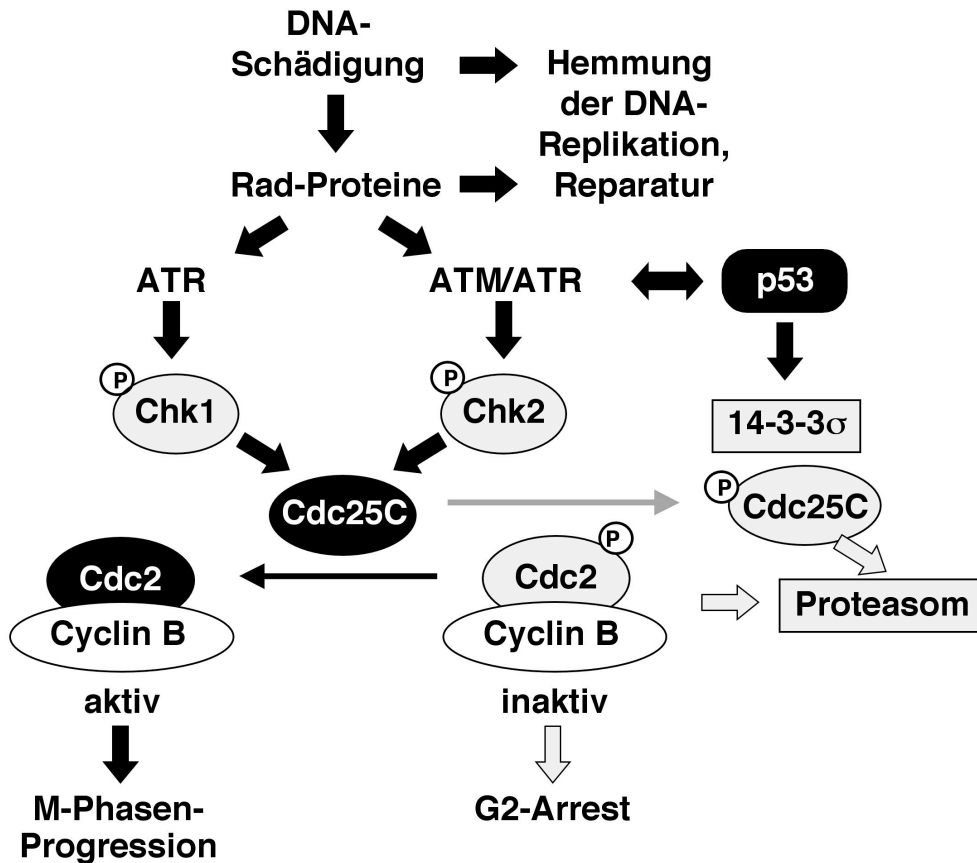


Abb. 10: Regulation von M-Phase-Progression und G2-Arrest

Der Komplex aus der aktiven CDK Cdc2 und Cyclin B vermittelt den Eintritt in die M-Phase des Zellzyklus. Um enzymatisch aktiv zu sein, muß Cdc2 dephosphoryliert werden. Ist die Cdc2 phosphoryliert, dann wird der Cyclin B/Cdc2 Komplex über das Proteasom abgebaut. Die Dephosphorylierung wird durch die Cdc25C Phosphatase vermittelt. Genotoxische Schäden z.B. nach Bestrahlung oder chemischer DNA-Schädigung und Hemmung der DNA-Replikation aktiviert über Rad-Proteine wie z.B. rad51 und rad9, die ATM und ATR-Kinasen, die dann die Chk1 und Chk2 Kinasen phosphorylieren und hierdurch aktivieren. Chk1 aktiviert die Wee-Kinasen und hemmt hierdurch die M-Phase-Progression (nicht in der Abbildung hervorgehoben). Chk1 und Chk2 phosphorylieren Cdc25C und hemmen hierdurch die Phosphatase, die im phosphorylierten Zustand an 14-3-3σ bindet und nach Ubiquitinylierung über das Proteasom abgebaut wird. Hierdurch wird die Dephosphorylierung von Cdc2 gehemmt und G2-Arrest ausgelöst. ATM und ATR aktivieren zudem p53 und vermitteln hierdurch einen Anstieg der 14-3-3σ Expressionsspiegel, wodurch die Cdc25 Inaktivierung verstärkt wird. Chk1 kann auch p53 phosphorylieren.

Der CDKI p21 wiederum kann den Zellzyklus in der G1-, S- und G2-Phase arretieren und hierdurch die Progression geschädigter Zellen im Zellzyklus verhindern²⁰⁶⁻²⁰⁸. Hierdurch ermöglicht p21 die Reparatur ansonsten fataler Schäden. Wird p21 inaktiviert, z.B. durch Verlust von p53 oder durch Gen-spezifischen knock-out in experimentellen Systemen, dann

kommt es nach DNA-Schädigung zur Entkopplung von S-Phase (also DNA-Synthese) und Mitose^{189,209,210}. Ohne sich zu teilen, akkumulieren solche Zellen DNA und werden hyperploid. Dies wird als Entkopplung von S-Phase und Mitose bezeichnet. Manche Autoren sprechen in diesem Zusammenhang auch, nicht ganz korrekt, von einer mitotischen Katastrophe, die letztlich zur Apoptose der betroffenen Zelle führt.

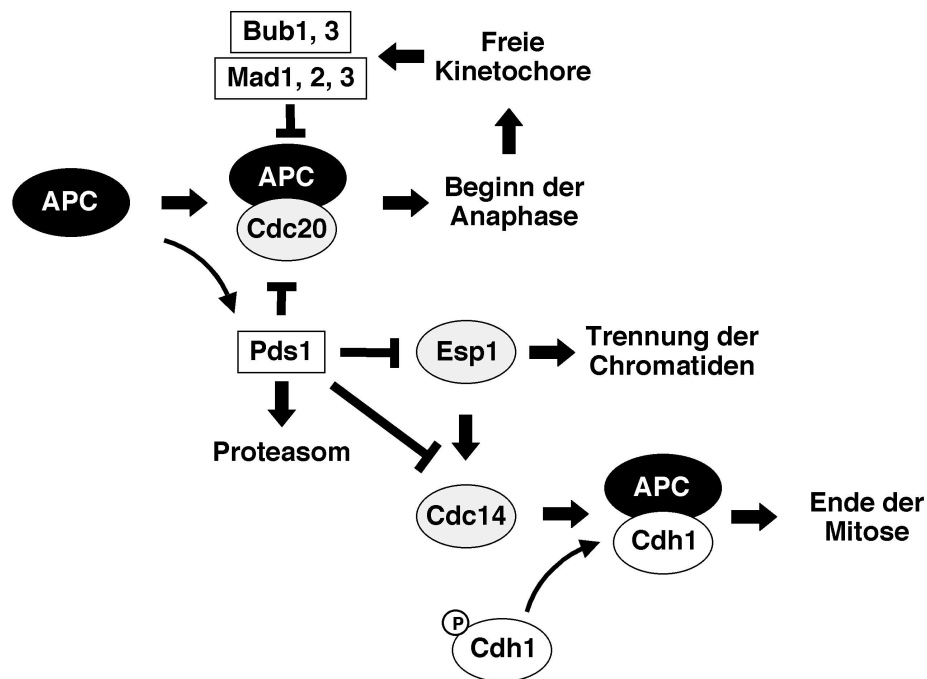


Abb. 11: Der Mad Signalweg

Der Eintritt der Zelle aus der G2-Phase in die Mitose wird durch die Aktivierung des APC-Proteins (**Anaphase-Promovierender Complex**) und die Inaktivierung von Cyclin B vermittelt. APC wirkt, indem es den Abbau regulatorischer Proteine über Ubiquitinylierung und Abbau über das Proteasom auslöst. APC inaktiviert hierdurch Pds1. Pds1 ist ein Inhibitor von Cdc20, Esp1 und Cdc14. Fällt die Hemmung durch Pds1 weg, in Folge der Sequestrierung von Pds1, dann assoziiert Cdc20 mit APC. Dieser Komplex vermittelt den Abbau von Cyclin B über das Proteasom und löst Eintritt in die Anaphase aus. Der Wegfall der Hemmung von Esp1 aktiviert die Trennung der Schwesterchromatiden in der Anaphase. Der Wegfall der Hemmung von Cdc14 führt zur Dephosphorylierung von Cdh1, das nun mit APC einen Komplex bilden kann. Dies gibt das Signal zur Beendigung der Mitose. Die APC/Cdc20- und APC/Cdh1-Komplexe inaktivieren mitotische B-Typ Zykline, indem sie deren Ubiquitinylierung und den Abbau über das Proteasom stimulieren. Sind zu Beginn der Mitose freie Kinetochore vorhanden oder liegt eine anderweitige Störung des Spindelapparats vor, dann werden Mitose-hemmende Signale aktiviert. Diese werden über Bub-Kinasen, Mad-Proteine und Pds1 vermittelt, die M-Phase Zellzyklusarrest vermitteln und den M-Phase Checkpoint aktivieren.

Nach Abschluß der G2-Phase beginnt die Mitose charakterisiert durch Trennung der Schwesterchromatiden und Entstehung der beiden Tochterzellen. In dieser Phase erfolgt die Anaphase-Checkpoint-Kontrolle ^{211,212}. Die Chromatiden werden über die Kinetochoren an die mitotische Spindel gekoppelt, die aktiv die Segregation der verdoppelten Chromatiden vermittelt. Sind Kinetochore unbesetzt, wird der Mad-Signalweg aktiviert (vgl. **Abb. 11**). Freie Kinetochore rekrutieren Bub-Kinasen, die die Aktivierung des APC/C-Komplexes verhindern ²¹³⁻²¹⁶. Die permanente Blockade dieser Signalmechanismen und permanenter Arrest der Zelle im Anaphase-Checkpoint, z.B. durch dominant negative Mutanten von Signalproteinen, wie der Bub1-Kinase, aktiviert die Apoptose-Signalkaskade und die Zelle stirbt über Apoptose ²¹⁴.

Durch diese strenge Kontrolle von Zellzyklusarrest sowie von Apoptose oder Zellüberleben wird in normalen Zellen dereguliertes Wachstum verhindert. Die Koordination einer Vielzahl komplexer, nachgeschalteter Regulationswege war somit aus evolutionsgeschichtlicher Sicht die Basis für die Entwicklung komplexer vielzelliger Organismen.

4. Signaldefekte als prognostische Faktoren

Aufgrund der Schwankungsbreite bei Gebrauch klinisch pathologischer Prognosefaktoren, wie z.B. dem UICC Stadium bei kolorektalen Karzinomen ²¹⁷ oder dem Binet-Stadium ²¹⁸ bei der chronischen lymphatischen Leukämie, besteht erheblicher Bedarf, die Prognose der Patienten präziser abzuschätzen. Dies gilt insbesondere auch im Hinblick auf den deutlichen Trend zu risikoadaptierten Tumorthérapien und neuen Tumorthérapeutika wie z.B. Kinasehemmern. Ein möglicher Weg ist, die zellulären Signalwege zu untersuchen, die an der Tumorentstehung, Tumorprogression und, insbesondere, der Aktivierung und Exekution von Zelltod nach zytotoxischer Tumorthérapie beteiligt sind. Die Störung von Zelltod- und Zellzyklus-Signalwegen trägt nicht nur zur Tumorentstehung bei, sondern ist mit verantwortlich für die Tumorbilogie und den klinischen Verlauf der Erkrankung.

So konnten Bcl-2 Familienmitglieder mittlerweile als pathogenetisch und auch prognostisch relevante Faktoren bei nahezu allen Neoplasien identifiziert werden ²¹⁹⁻²²⁹. So trägt die Mehrzahl der follikulären Lymphome die t(14;18) Translokation, die das Bcl-2 Gen mit dem Schwerketten-Enhancer des Immunglobulin-Genkomplexes assoziiert ²³⁰. Hierdurch kommt es zur deregulierten, konstitutiven Expression des Bcl-2 Proteins ^{8,9,231-233}. Die t(14;18) Translokation kann auch bei einigen wenigen hochmalignen B-Zell-Lymphomen und

chronischen lymphatischen Leukämien (CLL) nachgewiesen werden, ist für sich genommen aber nicht mit einer schlechteren klinischen Prognose assoziiert. Hingegen ist das Proteinexpressionsniveau, vor allem bei hochmalignen B-Zell-Lymphomen, mit einem schlechteren Ansprechen auf aggressive Polychemotherapie verbunden. Hohe Proteinexpression von Bcl-2 wird in diesen Tumoren also anscheinend durch von der t(14;18) Translokation unabhängige Faktoren reguliert.

Die Überexpression von Bcl-2 in B-Lymphozyten in transgenen Mäusen allein führt nur zur B-Zellhyperplasie ⁶ und nur in einem geringen Prozentsatz zu malignen B-Zell-Lymphomen, in denen dann zusätzlich Deregulation von c-myc nachgewiesen werden kann ¹⁴. Werden jedoch beide Transgene im B-Zell-Kompartiment zur Überexpression gebracht, dann entwickeln alle transgenen Mäuse hochmaligne B-Zell-Lymphome. Bcl-2 ist somit kein Onkogen im eigentlichen Sinne, sondern kooperiert bei der Onkogenese mit solchen Genen die Proliferation deregulieren, für sich allein betrachtet aber Apoptose in der betroffenen Zelle auslösen würden.

Bei der B-CLL wird im Vergleich zu anderen B-Zell-Lymphomen eine konstitutiv hohe Bcl-2 Expression gefunden. Die B-CLL ist durch niedrige Proliferationsrate verbunden mit der Akkumulation nicht teilungsaktiver, jedoch Apoptose-resistenter Lymphozyten charakterisiert. Die hohe Expression von Bcl-2, aber auch von dessen Homolog Mcl-1, könnte somit ein entscheidender pathogenetischer Faktor sein. Individuelle Unterschiede im Proteinexpressionsniveau dieser Regulatoren sind mit einem schlechteren Gesamtüberleben bzw. Therapieansprechen assoziiert ^{234,235}.

Ebenso kann bei einer Vielzahl von Tumoren der Verlust des pro-apoptotischen Bax-Proteins nachgewiesen werden. Eigene Arbeiten konnten bei einer Vielzahl von Tumoren zeigen, dass der Verlust von Bax mit schlechterem Therapieansprechen bzw. Prognose einhergeht ^{47-50,236-239}. Die Ursache für den Verlust von Bax ist in den meisten Tumoren noch ungeklärt, liegt aber wahrscheinlich auf transkriptioneller Ebene, da der Bax-Promotor einen extrem hohen Gehalt an CpG Inseln enthält, die aufgrund von Promotormethylierung für den Bax-Verlust verantwortlich sein könnten. Bax-Mutationen sind hingegen nur bei einem Teil der Patienten für den Expressionsverlust verantwortlich. Bax-Mutationen werden vor allem bei gastrointestinalen Tumoren (Magen- und kolorektale Karzinome) mit Defekten des DNA-Mismatch-Reparatursystems beobachtet ^{240,241}, sind aber bei den meisten hämatologischen Neoplasien extrem selten. Allerdings können sie bei den klinisch sehr aggressiven Burkitt-Lymphomen gehäuft nachgewiesen werden ²⁴². Im Gegensatz zum Bax-Expressionsverlust ist

die pathogenetische und klinische Relevanz der Bax-Mutation in diesen Tumoren jedoch noch ungeklärt.

Für APAF-1 bisher nur ansatzweise eine pathogenetische Relevanz nachgewiesen werden. Mutationen von APAF-1 wurden bisher bei Tumoren mit DNA-Mismatch-Reparatur-Defizienz beschrieben, bei denen Frameshift-Mutationen mit Verschiebung des Leserasters gezeigt wurden, für die bisher aber kein Bezug zum Therapieansprechen bzw. Resistenzverhalten gezeigt werden konnte ²⁴³. Expressionsunterschiede von APAF-1 korrelieren nicht mit der klinischen Prognose und knock-out Mäuse zeigen keine erhöhte Tumorzinzidenz. Dies macht die Existenz weiterer, komplementärer Gene wahrscheinlich, die die Funktion von APAF-1 ersetzen können. In der Tat resultiert der kombinierte Ausfall von APAF-1 in Kombination mit gleichzeitiger Überexpression von c-myc in einer hohen Rate von Tumoren im Maussystem ¹². Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass kürzlich in Melanomen die Inaktivierung von APAF-1 durch Promotormethylierung gezeigt wurde ²⁴⁴.

Inaktivierung von APAF-1 und Störung der Rekrutierung der Procaspase-9 kann ebenfalls mit Resistenz gegenüber Zytostatika-induziertem Zelltod einhergehen ^{244,245}. Ob dies von Relevanz für das klinische Ansprechen von malignen Tumoren auf zytotoxische Therapien ist, muß jedoch noch geklärt werden. Dies gilt auch für das SMAC/DIABLO Protein, das während der Apoptose aus Mitochondrien freigesetzt wird und IAPs inhibiert, somit also Apoptose-fördernd wirkt ^{67-70,246-248}. Unklar ist jedoch noch, ob SMAC/DIABLO-Verlust mit Therapieresistenz assoziiert ist.

Ebenso gibt es bisher kaum Hinweise für die Beteiligung von Caspase-Defekten an der Therapieresistenz von Tumoren. Die Mutation des Caspase-3 Gens resultiert in der MCF-7 Mammakarzinomlinie in einer nahezu vollständigen Hemmung der Zytostatika- und Bestrahlungs-induzierten Apoptose ^{249,250}. Die Überexpression der Procaspase-3 kann diesen resistenten Phänotyp überwinden ²⁴⁹. Ebenso vermag die Überexpression der Procaspase-3 eine erworbene Resistenz gegenüber Zytostatika-induzierter Apoptose in Mammakarzinomzellen mit geringer Wildtyp-Caspase-3 Expression zu durchbrechen (s.u.).
²⁵⁰.

Die einzige Caspase, für die bisher eine signifikante Rate von Mutationen in Tumoren gezeigt werden konnte, ist die Caspase-5, für die, wie auch für das Bax, APAF-1 und Bcl-10 Gen, bei Tumoren mit defektem DNA-Mismatch-Reparatur-System in Folge von Lesefehlern und „Verrutschen“ der DNA-Polymerase Mutationen beobachtet werden, die zur Verschiebung des Leserasters führen ²⁵¹. Mutationen der Caspase-10 hingegen wurden beim Canale-Smith

Syndrom, einem mit Autoimmunität assoziierten lymphoproliferativen Syndrom (ALPS) beschrieben und scheinen durch die Störung von Death-Rezeptor-Signalwegen an der Entstehung dieses Syndroms ursächlich beteiligt zu sein ²⁵²⁻²⁵⁵. Hinweise auf Caspase-10 Mutationen in Tumoren liegen bisher allerdings nicht vor. Caspase-8 hingegen kann durch Promotormethylierung, z.B. in Neuroblastomen, inaktiviert werden und dieser Expressionsverlust scheint mit einem aggressiveren Verlauf der Erkrankung einherzugehen ^{256,257}. Eigene Daten zeigten einen Defekt der Aktivität der Caspase-3 in rezidierten kindlichen akuten lymphoblastischen Leukämien ²³⁷ (s.u.). Bisher wurde jedoch außerhalb von Zelllinienmodellen bzw. den genannten Beispielen kein signifikanter Bezug zwischen dem Expressionsniveau oder potentieller Mutation von Caspasen und der Tumorbilogie bzw. dem Therapieansprechen von Tumoren nachgewiesen.

Eigene Ergebnisse:

4.1 Analyse des p53/Bax Signalwegs bei Patienten mit primär reseziertem kolorektalen Karzinom: niedrige Bax-Expression ist ein negativer prognostischer Faktor

Tumore des Kolorektums gehören zu den häufigsten Tumorerkrankungen in Europa und Nordamerika. Das Auftreten ist, bis auf wenige familiäre Syndrome, sporadisch und nur bei einem kleinen Teil der Patienten ist genetische Veranlagung die Ursache für die Tumorentstehung wie z.B. beim HNPCC-Syndrom (hereditäres, nicht polypöses Kolonkarzinom) bzw. dem FAP-Syndrom (familiäre adenomatöse Polypose des Kolons). Erfolgt die Diagnose in einem frühen Stadium, dann ist die Mehrzahl der Patienten durch chirurgische Tumoresektion heilbar. Zur klinischen Prognoseabschätzung wird die Klassifikation der UICC (union internationale contre le cancer) eingesetzt, die auf der TNM Klassifikation aufbaut. Die 5-Jahres-Überlebensrate mit nodal negativem Kolonkarzinom beträgt, je nach Studie und Stadium, 97 bis 63 %, wohingegen Patienten mit lokalem Lymphknotenbefall ein 5-Jahres-Überleben von 74 bis 38 % aufweisen. Patienten mit metastasierter Erkrankung versterben früh und die 5-Jahres-Überlebensrate ist unter 10%.

Ziel dieser Studie war, den prognostischen Wert der Bax-Expression und Mutation von p53, einem Aktivator des Bax Gens bei Patienten mit primär behandeltem kolorektalem Karzinom

zu untersuchen. Durchgeführt wurde eine retrospektive Analyse von Tumoren von 116 Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren, d.h. im Stadium UICC III (59 Patienten) und IV (57 Patienten), die primär operiert wurden. Die Tumore wurden mittels Immunhistochemie für Bax-Expression und mittels SSCP-PCR für p53-Mutationen untersucht. Das mediane Gesamtüberleben des Kollektivs betrug zum Zeitpunkt der Analyse 17 Monate. Wie erwartet, zeigten Patienten mit UICC III Stadium ein besseres medianes Überleben als Patienten mit Stadium UICC IV: 69 Monate gegenüber 8 Monaten ($p < 0.0001$). UICC III Tumore mit hoher Bax-Expression waren mit einem deutlich besseren Gesamtüberleben assoziiert ($p = 0.009$) im Vergleich zu Tumoren mit niedriger Bax-Expression. P53-Mutation konnte bei UICC Tumoren nicht signifikant zwischen gutem und schlechtem Überleben differenzieren. Durch Kombination von Bax und p53 konnte jedoch eine Patientengruppe im UICC III Stadium mit besonders schlechter Prognose identifiziert werden: Patienten mit Inaktivierung sowohl von Bax als auch p53 zeigten das schlechteste Überleben ($p = 0.004$). Bei der heterogenen Patientengruppe im Stadium UICC IV hingegen zeigten weder Bax-Expression noch p53-Mutation einen signifikanten Einfluss auf das Überleben.

Insgesamt zeigte diese Studie erstmals eine prognostische Bedeutung der Störung des p53/Bax Signalwegs bei Patienten mit primärem kolorektalem Karzinom (Manuskript eingereicht).

4.2 Analyse des p53/Bax Signalwegs in kolorektalen Karzinomen: Verlust von Bax ist ein negativer prognostischer Faktor für Patienten mit resezierten Lebermetastasen

Untersucht wurde in dieser Studie die prognostische Wertigkeit des Apoptose-Regulators Bax bei 42 Patienten mit Lebermetastasen kolorektaler Karzinome. Alle Patienten unterzogen sich einer Metastasenchirurgie mit kurativer Intention. Bei diesem Patientenkollektiv wurde retrospektiv die Expression der Proteinexpression von Bax, p21, p53 mittels Immunhistochemie und Bax- bzw. p53-Mutation mittels Fragmentlängen-Analyse bzw. SSCP-PCR (single stranded conformational polymorphism-polymerase chain reaction) analysiert.

Das mediane Gesamtüberleben betrug 41.1 Monate. Patienten mit starker zytoplasmatischer Bax-Expression zeigten ein medianes Überleben von 53.6 Monaten gegenüber 30.3 Monaten der Patienten mit niedriger Bax-Expression im Tumor ($p = 0.04$). Dieser Unterschied wurde

noch deutlicher bei Betrachtung von Patienten mit Wildtyp p53. Das mediane Überleben von Patienten mit Wildtyp p53 und starker Bax-Expression im Tumor lag bei 53.9 Monaten, wohingegen Patienten mit p53 Wildtyp und niedriger Bax-Expression ein medianes Überleben von nur 23.3 Monaten zeigten ($p=0.011$). Die multivariate Analyse ergab, dass niedrige Bax-Expression ein unabhängiger negativer prognostischer Faktor ist und Patienten mit niedrigem Bax ein 4.9-fach höheres Risiko haben, früh zu versterben. Hingegen zeigten p53-Expression und Mutation und p21-Expression keinen Einfluß auf den klinischen Verlauf¹⁸.

4.3 Analyse des p53/Bax/p16 Signalwegs beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus: Hohe Expression von Bax und p16 identifiziert Patienten mit guter Prognose.

In den oben beschriebenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass der Verlust der Bax-Expression bzw. die kombinierte Inaktivierung von Bax und p53 ein negativer prognostischer Faktor bei Adenokarzinomen des unteren Gastrointestinaltrakts ist. Um diese Studien fortzuführen, wurden Plattenepithelkarzinome des Ösophagus für Inaktivierung von Bax und p53 untersucht. Da für den Cyclin-abhängigen-Kinase-Inhibitor p16^{INK4a} eine Kooperation mit p53 im Zellzyklusarrest und in der Apoptose-Induktion gezeigt werden konnte, wurde die p16 Proteinexpression mittels Immunhistochemie untersucht und in die Überlebensanalysen einbezogen. Durchgeführt wurde eine retrospektive Analyse von Tumoren von 53 Patienten mit Plattenepithelkarzinom, bei denen unter kurativer Intention eine R0 Resektion des Tumors geplant war. Bax, p53 und p16 wurden mittels Immunhistochemie untersucht, der p53-Mutationsstatus wurde mittels SSCP-PCR bestimmt, Bax-Mutationen (Frameshift-Mutationen im G8 Trakt) wurden mit Hilfe der Fragmentlängenanalyse von PCR-Produkten bestimmt.

Das mediane Gesamtüberleben des Patientenkollektivs betrug 13.7 Monate nach Operation. Patienten mit hoher Bax-Expression zeigten ein medianes Überleben von 19.5 Monaten gegenüber 8 Monaten bei Patienten mit niedriger Bax-Expression im Tumor ($p < 0.005$). Ebenso war eine hohe p16-Expression mit einem medianen Überleben von 23.8 Monaten verknüpft gegenüber 9.7 Monaten für Patienten mit niedriger p16-Expression im Tumorgewebe ($p=0.011$). Das beste Überleben wurde in einer Untergruppe von Patienten beobachtet, deren Tumore beide günstige Phänotypen zeigten, also sowohl intakte Bax als auch p16-Expression (medianes Überleben 45.8 Monate). Der p53-Mutations- bzw. Expressionsstatus konnte nicht zwischen guter und schlechter Prognose unterscheiden. Bax-

Mutationen konnten, im Gegensatz zu kolorektalen und Magenkarzinomen, nicht nachgewiesen werden. Zusammenfassend konnte bei dieser retrospektiven Analyse mit Hilfe von Bax und p16 zwischen Patienten mit sehr guter (hohe Expression von Bax/p16) bzw. schlechter Prognose (Verlust von Bax und/oder p16) unterschieden werden ²³⁹.

4.4 Mutation von p53 bei B-CLL: Bezug zu Vortherapie mit alkylrierender Chemotherapie, Krankheitsprognose und Einfluß auf Zytostatika-induzierten Zelltod

Mutationen des p53 Tumorsuppressorgens werden bei etwa 10 % der Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie vom B-Zelltyp (B-CLL) gefunden. Sowohl für B-CLL Patienten mit p53-Mutation als auch für Patienten mit einer Deletion des Chromosoms 17p, der chromosomalen Lokalisation des p53 Gens, wurde eine schlechte Prognose gezeigt. Defekte des p53 Gens gehen in einer Reihe von Tumormodellen mit einem schlechteren Ansprechen auf zytotoxische Therapien, wie Chemotherapie und Bestrahlung, einher. Allerdings entstammen die meisten dieser Daten Zelllinienmodellen und nur wenige Berichte konnten bisher einen solchen Effekt in primären Tumorzellen zeigen. So existierten keine klaren Daten zum Einfluß von p53-Mutationen auf die Empfindlichkeit von CLL Zellen gegenüber einem Panel therapeutisch eingesetzter Zytostatika und Bestrahlung. Aus diesem Grund wurde der p53-Mutationsstatus von 138 Patienten bestimmt und mit dem Chemosensitivitätsprofil für Alkylantien, Fludarabin, Anthrazykline, Steroide und Vincristin von B-CLL Zellen verglichen. Chemosensitivität und Apoptose-Induktion in den CLL Zellen wurde mit Hilfe eines sensitiven morphometrischen Tests, dem DISC Test, *in vitro* bestimmt. Die Korrelation der p53-Mutation mit klinischen Daten ergab, dass p53-Mutationen bei den Patienten nachgewiesen werden konnten, die zuvor eine Chemotherapie, und zwar mit Alkylantien (Chlorambucil, Cyclophosphamid) erhalten hatten. Weiterhin ergaben die Analysen, dass die Apoptose-Induktion durch Alkylantien, Bestrahlung und, zu einem geringeren Grad, durch Fludarabin bei p53-mutierten Patienten gestört ist. Hingegen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Antwort gegen Doxorubicin, Steroide und Vincristin. Diese Analysen zeigen erstmals, dass Vortherapie mit Alkylantien mit dem Auftreten von p53-Mutationen assoziiert sind. Mögliche Ursachen sind direkte Mutagenese aber auch Selektion präexistenter, p53-mutierter Subklone. Diese Ergebnisse können zumindest teilweise die Entwicklung von Resistenzen gegenüber Zweit- und Drittlinien-Therapien erklären (Manuskript eingereicht).

4.5 Das Rezidiv der akuten lymphatischen Leukämie des Kindesalters ist mit einem Abfall der Bax/Bcl-2 Ratio und dem Verlust der spontanen Caspase-3 Prozessierung *in vivo* assoziiert

Wie bereits diskutiert, ist die Störung des p53/Bax Signalwegs an der Tumorgenese, Tumorprogression und der Entstehung von Therapieresistenz beteiligt. Die niedrige Expression des Apoptose-induzierenden Bax korreliert mit erworbener Zytostatika-Resistenz. Wie gezeigt, korreliert Bax-Verlust mit schlechterem Ansprechen auf Therapie und kürzerem Gesamtüberleben bei Patienten mit soliden Tumoren. Basierend auf diesem Hintergrund wurde der p53/Bax/Caspase-3 Signalweg bei gepaarten und ungepaarten Zellproben von Kindern mit akuter lymphoblastischer Leukämie analysiert. Verglichen wurden Proben von Patienten mit Primärdiagnose und von Patienten im Rezidiv der Erkrankung.

Die Analysen zeigten einen Verlust der Bax-Expression und einen Abfall der Bax/Bcl-2 Ratio im Rezidiv im Vergleich zur initialen Diagnose ($p = 0.013$, Wilcoxon Signed Rank-Test für gepaarte Proben, $p = 0.0039$, Mann-Whitney U-Test für ungepaarte Proben). Der Verlust der Bax-Expression war nicht die Folge von Bax-Frameshift Mutationen des G8 Trakts im Bax Gen und auch p53-Mutationen konnten als Ursache für den Bax-Verlust ausgeschlossen werden. Die Analyse der Caspase-3 Expression zeigte den Verlust der spontanen Caspase-3 Prozessierung im Rezidiv. Während 9 von 14 (64%) der gepaarten Proben bzw. 37 von 77 (48%) der ungepaarten Proben spontane Caspase-3 Prozessierung als Ausdruck hoher Apoptose-Empfindlichkeit zeigten, konnte dies bei keiner der gepaarten Proben und nur bei einem Patienten (1 aus 34 Patienten (2.9%)) aus den ungepaarten Proben zum Zeitpunkt des Rezidivs nachgewiesen werden. Inaktivierung von Bax korrelierte mit dem Verlust der Caspase-3 Prozessierung. Diese Ergebnisse zeigen, dass zum Zeitpunkt des ALL Rezidivs schwere Störungen des Apoptose-Signalwegs auf der Ebene von Bax und Caspase-3 auftreten, die möglicherweise ursächlich an der im Rezidiv beobachteten Therapieresistenz beteiligt sind ²³⁷.

5. Apoptose und zytotoxische Tumorthérapien

Nahezu alle nicht-chirurgischen Tumorthérapien basieren auf dem Prinzip, Zellzyklus-Arrest oder Apoptose in Tumorzellen auszulösen. Hieraus wird verständlich, dass die Inaktivierung zentraler Regulatoren dieser Signalwege mit Therapie-Resistenz verbunden ist. Jeder der erwähnten Signalwege kann zur Resistenzentstehung beitragen, und die Defekte können auf jeder Ebene der Signalwege auftreten.

Von besonderer Bedeutung für Therapieresistenz sind nach heutigem Erkenntnisstand die folgenden Ereignisse: (1) Störung von Zelltod-Signalwegen. Letztere können durch Funktionsverlust Zelltod-fördernder Gene oder Überaktivität Zelltod-hemmender Signale entstehen. (2) Überaktivität von DNA-Reparatur-Mechanismen und (3) verstärkte Entgiftung zytotoxischer Substanzen, z.B. durch Überexpression von entgiftenden Pumpenproteinen und metabolischer Entgiftungs-Stoffwechselwege wie z.B. Glutathion-Konjugation. Die Wertigkeit der einzelnen Signaldefekte ist derzeit Gegenstand intensiver Diskussionen.

Wie eine Vielzahl zellbiologischer Untersuchungen *in vitro* und im Tiermodell zeigte, ist die Deregulation von Todesrezeptoren und deren Liganden kein wesentlicher Faktor beim Zytostatika-induzierten Zelltod und der Entstehung von Therapie-Resistenz. So sterben Zellen, in denen Rezeptor-vermittelte Apoptose-Signale mit Hilfe dominant negativer Signalproteine blockiert wurde (z.B. dominant negativem FADD) genauso gut wie Wildtyp-Zellen nach Gabe verschiedenster Zytostatika oder Bestrahlung²⁵⁸⁻²⁶².

Von zentraler Bedeutung für die Entstehung von Therapie-Resistenz ist aber die Inaktivierung des p53-Signalwegs und der vor- und nachgeschalteten Regulatoren, also insbesondere von DNA-Reparatur, Zellzyklus-Checkpoint-Regulatoren und der nachgeschalteten Apoptose-Signalkaskaden^{206,263}.

Ziel gegenwärtiger neuer Therapie-Ansätze ist daher, diese Resistenz-Mechanismen gezielt zu durchbrechen bzw. zu umgehen. Die genaue Kenntnis der molekularen Grundlagen liefert hierzu neue, erfolgversprechende Ansätze. In einigen dieser Situationen haben solche Erkenntnisse zur Entwicklung bereits klinisch erfolgreicher, spezifischer Strategien geführt, um den resistenten Phänotyp aufzuheben oder zu umgehen, wie z.B. im Fall der Taxane, die bei p53-mutierten Tumoren gute Wirksamkeit zeigen, teils sogar besser zu wirken scheinen im Vergleich zu p53-Wildtyp-Tumoren²⁶⁴⁻²⁶⁹.

Ein besonders gutes Beispiel für den Erfolg einer solchen gezielten molekularen Behandlungsstrategie ist aber die Hemmung der Abl-Kinase durch den Tyrosinkinase-

Inhibitor STI-571 im Fall der chronischen myeloischen Leukämie (CML) und der bcr-abl positiven akuten lymphatischen Leukämie (ALL)^{270,271}. Hierdurch werden Proliferations- und Überlebenssignale, z.B. über den Ras-Signalweg¹⁵ und die Akt-Kinase²⁷² spezifisch abgeschaltet. Die malignen Zellen werden im Wachstum gebremst, sterben spontan oder werden empfindlicher für weitere zytotoxische Therapien. Ähnliche Effekte konnten mittlerweile auch für Hemmer des Ras-Signalwegs wie z.B. Farnesyltransferase-Inhibitoren gezeigt werden²⁷³⁻²⁷⁸. Allerdings sind auch bei Einsatz dieser Substanzen Resistenzentwicklungen beobachtet worden²⁷⁹⁻²⁸².

Andere Ansätze zielen darauf, Signaldefekte in Tumoren, z.B. bei der Zellzyklusregulation oder durch Überaktivität des EGF-Rezeptors spezifisch zu attackieren und hierdurch normale Zellen vor zytotoxischen Nebenwirkungen zu schützen. Ein Beispiel hierfür ist der Einsatz von Hemmern der Cyclin-abhängigen Kinasen, z.B. durch den Kinase-Inhibitor Flavopiridol²⁸³ bzw. Tyrosinkinaseinhibitoren des EGF-Rezeptors²⁸⁴⁻²⁸⁶. Diese Substanzen lösen Zellzyklus-Arrest aus und können, wie auch STI-571, Tumor-spezifisch Apoptose auslösen.

Weitere Strategien zielen auf die Entwicklung niedermolekularer pharmakologischer Substanzen, die mit Zelltodsignalwegen interagieren, z.B. mutiertes und hierdurch missgefaltetes p53-Protein in eine funktionelle Form zurückfalten oder die Hemmung von p53 durch Mdm-2 durch Blockade der Bindungstaschen aufheben²⁸⁷. Wieder andere Strategien zielen auf die Inaktivierung von Bcl-2, z.B. durch Antisense-Oligonukleotide, die aktuell bereits in klinischen Studien evaluiert werden, z.B. bei B-Zell-Lymphomen und dem malignen Melanom²⁸⁸⁻²⁹⁰. Weitere Therapieansätze wiederum zielen auf die direkte Aktivierung des mitochondrialen Apoptosoms, z.B. durch Substanzen, die an den peripheren Benzodiazepin-Rezeptor binden und mitochondriale Permeabilitätssteigerung auslösen^{291,292}, oder Peptide mit Sequenzhomologie zur BH3-Domäne bzw. niedermolekulare Substanzen, um hierdurch Bax und seine Homologen aus der Bindung an Bcl-2/Bcl-xL zu befreien²⁹³⁻²⁹⁷.

Vergleichbare Ziele werden auch durch gentherapeutische Ansätze verfolgt, in denen Apoptose-fördernde und Zellzyklus-hemmende Gene mit Hilfe viraler Gentherapie-Vektoren in Tumorzellen eingeschleust werden, um diese im Wachstum zu hemmen bzw. in die Apoptose zu treiben.

Einige dieser Therapiestrategien zeigen bereits Wirksamkeit in klinischen Phase I/II Studien, und es darf mit Spannung erwartet werden, wann sich dies in verbesserten Therapie-Modalitäten für Tumorpatienten im klinischen Alltag niederschlagen wird.

Wichtig für solche molekulare Therapien ist das genaue Verständnis der betreffenden Signalwege. Biochemische und genetische Analysen haben in den letzten Jahren zu einem erheblich verbesserten Verständnis der Apoptose-Signalwege beigetragen. Wesentliche Aspekte dieser Signalwege sind in ihren Grundzügen aufgeklärt. Allerdings bestehen erhebliche Divergenzen in der Literatur, welche Signalwege entscheidend und in welchem Umfang zum Zelltod durch zytotoxische Tumorthapeutika beitragen. Dies gilt insbesondere für die Rolle Rezeptor-vermittelter Apoptose-Signale und deren Stellenwert im Vergleich zu mitochondrialen Signalen.

Die im Folgenden geschilderten Ergebnisse weisen auf den besonderen Stellenwert der mitochondrialen Apoptose-Signalkaskade im Rahmen des Therapie-induzierten Zelltods und der Prognose maligner Tumoren hin.

Eigene Ergebnisse

5.1 Aktivierung von Caspase-8 beim Zytostatika-induzierten Zelltod in B-Lymphomzellen ist unabhängig von CD95 Rezeptor/Ligand Interaktion und erfolgt im Signalweg unterhalb der Caspase-3 Aktivierung

In dieser Arbeit wurde die Aktivierung der Caspase-8, eines wichtigen Vermittlers im „CD95“-Death-Rezeptor Signalweg, bei der Epirubicin- und Taxol-induzierten Apoptose von B-Lymphomzellen untersucht. Diese Experimente wurden durchgeführt, da die funktionelle CD95/Fas Rezeptor/Liganden Interaktion, die Rekrutierung des FADD Adaptermoleküls und die konsekutive Aktivierung der Procaspase-8 von mehreren Autoren beim Zytostatika-induzierten Zelltod von Tumorzellen gezeigt wurde. Tatsächlich konnte Aktivierung der Caspase-8 in reifen und unreifen B-Lymphomzellen nach Behandlung mit Epirubicin oder Taxol nachgewiesen werden.

Jedoch konnte in diesen Zellkulturen keine konstitutive oder induzierte Expression des CD95/Fas Liganden nachgewiesen werden. Weiterhin konnte die Überexpression einer dominant-negativen FADD-Mutante (FADDdn) die Aktivierung der Caspase-8 und apoptotische DNA-Fragmentierung nicht blockieren. Dies zeigt, dass Caspase-8 Aktivierung nach Zytostatika-Exposition unabhängig von CD95 und FADD erfolgt. Aktivierung der

Caspase-3 ging der Aktivierung der Caspase-8 voraus. Dies legte nahe, dass Caspase-8 Aktivierung in B-Lymphomzellen ein sekundäres Ereignis ist und durch andere, zuvor aktivierte Caspasen vermittelt wird. Diese Annahme konnte durch 2 experimentelle Systeme bestätigt werden: (1) zDEVD-fmk, ein zellpermeabler Inhibitor der Caspase-3 blockierte die Zytostatika-induzierte Caspase-8 Spaltung und (2) die Depletion der Caspase-3 aus Zellextrakten verhinderte vollständig die Aktivierung der Caspase-8 in einem zellfreien *in vitro* System nach Zugabe von Cytochrom c und dATP. Diese Ergebnisse belegen nicht nur, dass der Zytostatika-induzierte Zelltod unabhängig von CD95 und seinem Liganden ist, sondern deuten auch darauf hin, dass die Caspase-8 neben ihrer Funktion als Inducer-Caspase beim Rezeptor-vermittelten Zelltod auch als im Signalweg nachgeschaltete Effektor-Caspase wirken kann. In diesem Fall erfolgt die Prozessierung der Procaspase-8 zum aktiven Holoenzym nach der Aktivierung der Mitochondrien und der Caspase-3²⁵⁸.

5.2 Bax-Expression korreliert mit zellulärer Zytostatika-Sensitivität gegenüber Doxorubicin, Cyclophosphamid und Chlorambucil aber nicht für Fludarabin, Cladribin oder Glukokortikoiden bei B-zellulärer chronischer lymphatischer Leukämie

Neben der deregulierten Proliferation spielt bei der B-zellulären chronischen lymphatischen Leukämie (B-CLL) die Akkumulation nicht-proliferierender maligner Zellen in Folge von Apoptosedefekten eine wesentliche Rolle. Zytotoxische Tumorthérapien wiederum aktivieren Apoptosesignale, und die Störung solcher Signalwege resultiert in Therapieresistenz. Neben gesteigerter Expression des Apoptose-hemmenden Bcl-2 Proteins kann Therapieresistenz, wie bereits in soliden Tumoren gezeigt (s.o.), durch Verlust des Bax Proteins entstehen. Basierend auf diesen Daten wurde daher das Expressionsniveau von Bax und Bcl-2 mit Chemoresistenzprofilen von B-CLL Zellen korreliert. Hierfür wurden Tumorzellen von 39 Patienten mit B-CLL *in vitro* mit einem Panel von Zytostatika inkubiert. Apoptose-Induktion und Dosiswirkungskurven wurden mittels eines morphometrischen Tests (DISC-Test) bestimmt. Hohe Bax-Spiegel korrelierten mit Chemosensitivität für Anthrazykline, Alkylantien und Vincristin. Hingegen wurde keine Korrelation zur Aktivität von Nukleosidanaloga (Fludarabin, Cladribin) und Glukokortikoiden gefunden. Interessanterweise ergab sich keine Korrelation mit dem bei B-CLL generell hohen Expressionsniveau von Bcl-2. Hieraus ergibt sich, dass Bax ein wesentlicher Regulator für einige, aber nicht alle

Zytostatika ist, die in der Therapie der CLL Anwendung finden. Neben dem besseren Verständnis von Therapieresistenz-Mechanismen bei CLL liefern diese Daten eine erste molekulare Rationale für die Gabe von Substanzen, die solche Apoptose-Defekte umgehen können, wie z.B. die Nukleosid-Analoga, bei bestimmten Resistenz-Typen, wie z.B. dem Verlust von Bax⁵⁰.

5.3 Expression des Zelltodgens NbK/Bik sensibilisiert Glukokortikoid-resistente T Lymphomzellen für Zytostatika-induzierte Apoptose und hemmt Tumorwachstum in Mäusen mit schwerem kombiniertem Immundefekt (SCID)

Die Beteiligung von Mitgliedern der Bcl-2 Genfamilie beim Zytostatika-induzierten Zelltod wurde in einer Vielzahl von Systemen gezeigt. Bei B-Zelllymphomen ist die hohe Expression von Bcl-2 ein unabhängiger negativer prognostischer Faktor und die Überexpression von Bcl-2 löst Resistenz gegen Zytostatika aus, da die Zytostatika-induzierte Apoptose gehemmt wird. Umgekehrt war unklar, ob die Überexpression von Apoptose-fördernden Mitgliedern der Bcl-2 Genfamilie Zytostatika-Resistenz durchbrechen kann. Als Modellsystem wurde die T-Lymphomlinie H9 (CD3/CD4-positiv, CD8-negativ) verwandt, die Glukokortikoid-resistent ist und kein endogenes NbK/Bik (Natural born killer/Bcl-2 interacting killer) exprimiert. Überexpression von NbK in H9 Zellen erhöhte die Empfindlichkeit für Epirubicin, Taxol und Etoposid um das 10- bis 39-fache. Weiterhin wurde die Sensitivität für Hitzeschock-induzierte Apoptose gesteigert. Die komplette Hemmung des Tumorwachstums in einem Xenotransplantationsmodell in SCID Mäusen legt nahe, dass NbK/Bik, wie auch Bax, als Tumorsuppressoren wirken könnte²⁹⁸.

5.4 Die Apoptose-fördernden Bcl-2 Homologe Bak und NbK/Bik überwinden Zytostatika-Resistenz in Mdr-1 negativen und Mdr-1 überexprimierenden Mammakarzinom-Zelllinien

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob durch Manipulation der Apoptose-Signalkaskade durch Überexpression Apoptose-fördernder Bcl-2 Homologe verschiedene Resistenztypen durchbrochen werden können. Dies sollte in folgenden Modellen untersucht werden: (1) der MT1-Adr Linie, in der die Aktivierung der mitochondrialen Apoptose durch hohe Spiegel an

Bcl-2 gestört ist und (2) der MT3-Adr Linie, die P-Glycoprotein/Mdr-1 überexprimiert und somit verschiedene Zytostatika aufgrund der hohen Aktivität dieses ATP-abhängigen ABC-Transporters entgiften kann.

Die Überexpression des Apoptose-fördernden Bax Homologs Bak (enthält wie auch Bax eine BH1, BH2 und BH3 Domäne) oder des BH3-only Proteins Nbk/Bik (enthält nur die BH3 Domäne und ist somit ein minimales „Apoptose-Modul“) revertierte, wie erwartet, den resistenten Phänotyp der MT1-Adr Zellen. Während Bak die Resistenz vollständig aufhob, konnte Nbk die Resistenz nur partiell revertieren. Weiterhin konnten sowohl Bak als auch Nbk die Resistenz in MT3-Adr Mammakarzinom-Zellen für Epirubicin-induzierten Zelltod teilweise aufheben. Weder die Aktivität der Mdr-1 Pumpe noch die Aufnahme der Zytostatika in die Zelle wurde durch Bak oder Nbk/Bik verändert. Diese Ergebnisse zeigen somit, dass Bak und Nbk nicht nur Defekte in der mitochondrialen Apoptose-Signalkaskade überwinden können, sondern auch „klassische“ Zytostatikaresistenz durchbrechen, die durch verstärkte Entgiftung und Efflux von Zytostatika vermittelt wird ²⁹⁹. Bak und Nbk könnten somit Zielstrukturen zur Entwicklung neuer Tumortheraeutika darstellen ²⁹⁸.

5.5 Überexpression von Caspase-3 vermittelt Sensitivität für Zytostatika-induzierten Zelltod in Mammakarzinomzellen mit erworbener Zytostatikaresistenz

Analog zur Überexpression von Nbk und Bak in MT1-Adr Mammakarzinom-Zellen wurde die Frage untersucht, ob die Überexpression von Caspase-3, einem zentralen Effektormolekül in der Exekution der Apoptose, Mammakarzinom-Zellen mit erworbener Resistenz (MT1-Adr) für Zytostatika-induzierten Zelltod sensibilisieren kann. Als Kontrollsystem wurden MCF-7 Zellen verwandt, die aufgrund einer Mutation im Caspase-3 Gen die Expression von Caspase-3 vollständig verloren haben. Während Casase-3-negative, kontrolltransfizierte MCF-7 Zellen Apoptose-resistent gegenüber Epirubicin, Etoposid und Taxol waren, lösten die gleichen Zytostatika starke Apoptose-Induktion und Fragmentierung der genomischen DNA aus. MT1-Adr Zellen exprimieren nur geringe Mengen an Caspase-3 und zeigen nach Behandlung mit Zytostatika keine intakte Casase-3 Aktivierung. Aufgrund der endogenen hohen Bcl-2 Expression zeigen die MT1-Adr Zellen ebenfalls eine verminderte Aktivierbarkeit der Mitochondrien, gemessen durch Messung des mitochondrialen Membranpotentials. MT1-Adr Klone, die mit Hilfe eines retroviralen LSXN-Caspase-3

Vektors transfiziert wurden und Caspase-3 2.8-fach überexprimierten, zeigten eine 3.7-fach erhöhte maximale Caspase-3 Aktivierbarkeit nach Aktivierung in einem zellfreien *in vitro* System. Procaspase-3 Überexpression war nicht toxisch und war auch nicht mit einer erhöhten Hintergrundapoptose der Tumorzellen verbunden. Die Caspase-3 Transfektanten zeigten jedoch eine höhere Empfindlichkeit für Zytostatika-induzierten Zelltod und erreichten nahezu dieselbe Empfindlichkeit der Zytostatika-sensitiven MT1 Mutterlinie. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Überexpression von Procaspase-3 Zytostatika-Resistenz durchbrechen kann und zwar auch in solchen Situationen, in denen die Aktivierung des mitochondrialen Apoptosoms gestört ist²⁵⁰.

6. Ausblick

Der Wissensfortschritt der letzten Jahre hat erste tiefgreifende Einblicke in die komplexen Regelwerke geliefert, die Zellvermehrung, Zellüberleben und genetische Stabilität regulieren. Diese Erkenntnisse haben vor allem eines gelehrt: die Zusammenhänge sind ungeheuer komplex und werden durch eine Vielzahl, in ihrer Funktion bislang erst ansatzweise erkannter Faktoren reguliert. Durch die Sequenzierung des humanen Genoms wird die Komplexität durch die Identifikation weiterer Regulatoren in der nächsten Zukunft erst einmal weiter erhöht.

Für die Entwicklung neuer, selektiver Therapiestrategien von Tumoren ist das genaue Verständnis dieser regulatorischen Zusammenhänge zwischen Zellzyklus, Apoptose und DNA-Reparatur Grundvoraussetzung. Durch die Entschlüsselung des humanen Genoms und die Übertragung von Forschungsergebnissen aus anderen Organismen, wie beispielsweise den Hefen, werden sich eine Vielzahl neuer Zusammenhänge ergeben, die auf einen rascheren Fortschritt nicht nur im Verständnis der funktionellen Zusammenhänge, sondern auch neuer, innovativer Therapien hoffen lassen.

Dennoch besteht Grund zum Optimismus: erste wichtige Regelwerke sind in ihren Grundzügen erkannt. Durch die Sequenzierung weiterer kompletter Genome von z.B. *C. elegans*, Hefen, und anderen Organismen und deren funktionelle Analyse in diesen Modellorganismen werden bereits bekannte und auch neue Zusammenhänge und Mechanismen auf den Menschen leichter zu übertragen sein. Gerade die Erkenntnisse aus der

Hefegenetik haben wesentlich zum besseren Verständnis der Zellzyklusregulation und DNA-Reparatur humaner Zellen und deren Störung in Tumoren beigetragen.

Dies ist die Basis für einen völlig neuen Forschungszweig: der vergleichenden und der funktionellen Genomik, welche die nun geschätzten ca. 30000 bis 40000 Gene des humanen Genoms in das funktionelle Regelwerk der genannten und auch neuer Signalwege bringen wird. Hierdurch wird in den nächsten Jahren ein dramatischer Erkenntnisgewinn einsetzen. Dieser Fortschritt wird uns mit geeigneteren Behandlungsmethoden und Therapiestrategien ausstatten, um gezielt die Signal-defekte in malignen Tumoren bezüglich der Zellzyklus- und Apoptose-Regulation zur Therapie dieser Erkrankungen zu nutzen.

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt allen Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe, die aufgrund ihres persönlichen Engagements tatkräftig an den in dieser Arbeit erwähnten wissenschaftlichen Veröffentlichungen mitgewirkt haben. Insbesondere möchte ich an dieser Stelle Dr. med. Isrid Sturm, PD Dr. rer. nat. Thomas Wieder, Dr. rer. nat. Bernhard Gillissen und Dr. med. Philipp Hemmati für die konstruktive Zusammenarbeit und die vielen anregenden und produktiven Diskussionen danken, die sich in den Veröffentlichungen der letzten Jahre wiederfinden lassen.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Professor Dr. med. Bernd Dörken für die langjährige Zusammenarbeit, wissenschaftliche Förderung und die stete Unterstützung, vor allem auch im harten Klinikalltag. Besonders verbunden bin ich meinem Mentor Professor Peter Krammer, durch den sich für mich das Feld der Apoptose-Forschung eröffnet hat. Seine klare und analytische Sicht wissenschaftlicher Sachverhalte hat meine Arbeiten wesentlich geprägt.

Danken möchte ich an dieser Stelle auch meinen nationalen und internationalen Kooperationspartnern, insbesondere Professor Dr. rer. nat. Klaus Schulze-Osthoff, Professor Dr. med. Matthias Lorenz, Prof. Dr. med. Steffen Hauptmann und Dr. Andrew Bosanquet für die konstruktive und angenehme Zusammenarbeit.

Last but not least möchte ich meiner Familie danken, die mich während vieler schwerer Zeiten selbstlos unterstützte und ohne die ich nicht in der Lage gewesen wäre, diesen Weg zu gehen.

Literatur

1. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26:239-57.
2. Meier P, Finch A, Evan G. Apoptosis in development. *Nature*. 2000;407:796-801.
3. Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*. 2001;411:342-8.
4. Krammer PH, Behrmann I, Daniel P, Dhein J, Debatin KM. Regulation of apoptosis in the immune system. *Curr Opin Immunol*. 1994;6:279-89
5. Daniel PT. Dissecting the pathways to death. *Leukemia*. 2000;14:2035-44
6. McDonnell TJ, Deane N, Platt FM, Nunez G, Jaeger U, McKearn JP, Korsmeyer SJ. bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell*. 1989;57:79-88.
7. Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*. 1988;335:440-2.
8. Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science*. 1984;226:1097-9.
9. Pegoraro L, Palumbo A, Erikson J, Falda M, Giovanazzo B, Emanuel BS, Rovera G, Nowell PC, Croce CM. A 14;18 and an 8;14 chromosome translocation in a cell line derived from an acute B-cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81:7166-70.
10. Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature*. 1991;352:345-7.
11. Burns PA, Kemp CJ, Gannon JV, Lane DP, Bremner R, Balmain A. Loss of heterozygosity and mutational alterations of the p53 gene in skin tumours of interspecific hybrid mice. *Oncogene*. 1991;6:2363-9.
12. Soengas MS, Alarcon RM, Yoshida H, Giaccia AJ, Hakem R, Mak TW, Lowe SW. Apaf-1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition. *Science*. 1999;284:156-9.
13. Wyllie AH, Bellamy CO, Bubbs VJ, Clarke AR, Corbet S, Curtis L, Harrison DJ, Hooper ML, Toft N, Webb S, Bird CC. Apoptosis and carcinogenesis. *Br J Cancer*. 1999;80:34-7.
14. McDonnell TJ, Korsmeyer SJ. Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18). *Nature*. 1991;349:254-6.
15. Adjei AA. Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93:1062-74.
16. Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*. 2001;411:366-74.
17. Reed JC. Bcl-2 family proteins. *Oncogene*. 1998;17:3225-36.
18. Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*. 2000;407:789-95.
19. Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med*. 2000;6:513-9
20. Daniel PT, Sturm I, Wieder T, Schulze-Osthoff K. The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. *Leukemia*. 2001;15:1022-32
21. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*. 2000;403:98-103.
22. Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S, del Rio G, Ellerby LM, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *J Biol Chem*. 2001;276:33869-74.
23. Nunez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene*. 1998;17:3237-45.
24. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ*. 1999;6:1028-42.
25. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J*. 1995;14:5579-88.

26. Jiang Y, Woronicz JD, Liu W, Goeddel DV. Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science*. 1999;283:543-6.
27. Tschopp J, Martinon F, Hofmann K. Apoptosis: Silencing the death receptors. *Curr Biol*. 1999;9:R381-4.
28. Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An APAF-1/cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem*. 1999;274:11549-56.
29. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 1997;91:479-89.
30. Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*. 1997;90:405-13.
31. Boldin MP, Varfolomeev EE, Pancer Z, Mett IL, Camonis JH, Wallach D. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem*. 1995;270:7795-8.
32. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell*. 1995;81:505-12.
33. Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, Baldwin D, Ramakrishnan L, Gray CL, Baker K, Wood WI, Goddard AD, Godowski P, Ashkenazi A. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science*. 1997;277:818-21.
34. Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell*. 1993;75:1169-78.
35. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*. 1995;3:673-82.
36. Banner DW, D'Arcy A, Janes W, Gentz R, Schoenfeld HJ, Broger C, Loetscher H, Lesslauer W. Crystal structure of the soluble human 55 kD TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell*. 1993;73:431-45.
37. Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell*. 1996;85:817-27.
38. Kischkel FC, Lawrence DA, Tinel A, LeBlanc H, Virmani A, Schow P, Gazdar A, Blenis J, Arnott D, Ashkenazi A. Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J Biol Chem*. 2001;276:2111-21.
39. Duan H, Dixit VM. RAIDD is a new 'death' adaptor molecule. *Nature*. 1997;385:86-9.
40. Hsu H, Huang J, Shu HB, Baichwal V, Goeddel DV. TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity*. 1996;4:387-96.
41. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*. 1998;281:1322-6.
42. Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 1993;74:609-19.
43. Farrow SN, White JH, Martinou I, Raven T, Pun KT, Grinham CJ, Martinou JC, Brown R. Cloning of a bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K. *Nature*. 1995;374:731-3.
44. Chittenden T, Harrington EA, O'Connor R, Flemington C, Lutz RJ, Evan GI, Guild BC. Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. *Nature*. 1995;374:733-6.
45. Hsu SY, Kaipia A, McGee E, Lomeli M, Hsueh AJ. Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:12401-6.
46. McCurrach ME, Connor TM, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Lowe SW. bax-deficiency promotes drug resistance and oncogenic transformation by attenuating p53-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:2345-9.
47. Wagener C, Bargou RC, Daniel PT, Bommert K, Mapara MY, Royer HD, Dörken B. Induction of the death-promoting gene bax-alpha sensitizes cultured breast-cancer cells to drug-induced apoptosis. *Int J Cancer*. 1996;67:138-41.

48. Sturm I, Kohne CH, Wolff G, Petrowsky H, Hillebrand T, Hauptmann S, Lorenz M, Dörken B, Daniel PT. Analysis of the p53/BAX pathway in colorectal cancer: low BAX is a negative prognostic factor in patients with resected liver metastases. *J Clin Oncol.* 1999;17:1364-74
49. Raisova M, Bektas M, Wieder T, Daniel P, Eberle J, Orfanos CE, Geilen CC. Resistance to CD95/Fas-induced and ceramide-mediated apoptosis of human melanoma cells is caused by a defective mitochondrial cytochrome c release. *FEBS Lett.* 2000;473:27-32
50. Bosanquet, Sturm I, Wieder T, Essmann F, Bosanquet MI, Head DJ, Dörken B, Daniel PT. Bax-Expression correlates with cellular drug sensitivity to doxorubicin, cyclophosphamide and chlorambucil but not fludarabine, cladribine or corticosteroids in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2002;15:in press
51. Jürgensmeier JM, Xie ZH, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Nat Acad Sci USA.* 1998;95:4997-5002
52. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science.* 1997;275:1129-32
53. Van der Heiden MG, Thompson CB. Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nat Cell Biol.* 1999;1:E209-E16
54. Martinou JC, Green DR. Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2:63-7.
55. Shimizu S, Ide T, Yanagida T, Tsujimoto Y. Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the voltage-dependent anion channel that is permeable to cytochrome c. *J Biol Chem.* 2000;275:12321-5.
56. Shimizu S, Shinohara Y, Tsujimoto Y. Bax and Bcl-xL independently regulate apoptotic changes of yeast mitochondria that require VDAC but not adenine nucleotide translocator. *Oncogene.* 2000;19:4309-18.
57. Tsujimoto Y, Shimizu S. VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins. *Cell Death Differ.* 2000;7:1174-81.
58. Vieira HL, Haouzi D, El Hamel C, Jacotot E, Belzacq AS, Brenner C, Kroemer G. Permeabilization of the mitochondrial inner membrane during apoptosis: impact of the adenine nucleotide translocator. *Cell Death Differ.* 2000;7:1146-54.
59. Benedict MA, Hu Y, Inohara N, Nunez G. Expression and functional analysis of Apaf-1 isoforms. Extra Wd-40 repeat is required for cytochrome c binding and regulated activation of procaspase-9. *J Biol Chem.* 2000;275:8461-8.
60. Hu Y, Benedict MA, Ding L, Nunez G. Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis. *Embo J.* 1999;18:3586-95.
61. Saleh A, Srinivasula SM, Acharya S, Fishel R, Alnemri ES. Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation. *J Biol Chem.* 1999;274:17941-5.
62. Hu Y, Ding L, Spencer DM, Nunez G. WD-40 repeat region regulates Apaf-1 self-association and procaspase-9 activation. *J Biol Chem.* 1998;273:33489-94.
63. Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell.* 1998;1:949-57.
64. Lorenzo HK, Susin SA, Penninger J, Kroemer G. Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ.* 1999;6:516-24.
65. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature.* 1999;397:441-6.
66. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell.* 2000;102:33-42.
67. Wu G, Chai J, Suber TL, Wu JW, Du C, Wang X, Shi Y. Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature.* 2000;408:1008-12.
68. Liu Z, Sun C, Olejniczak ET, Meadows RP, Betz SF, Oost T, Herrmann J, Wu JC, Fesik SW. Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain. *Nature.* 2000;408:1004-8.
69. Chai J, Du C, Wu JW, Kyin S, Wang X, Shi Y. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature.* 2000;406:855-62.

70. Srinivasula SM, Datta P, Fan XJ, Fernandes-Alnemri T, Huang Z, Alnemri ES. Molecular determinants of the caspase-promoting activity of Smac/DIABLO and its role in the death receptor pathway. *J Biol Chem.* 2000;275:36152-7.
71. Samali A, Cai J, Zhivotovsky B, Jones DP, Orrenius S. Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells. *Embo J.* 1999;18:2040-8.
72. Pan G, O'Rourke K, Dixit V. Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex. *J Biol Chem.* 1998;273:5841-5.
73. Chipuk JE, Bhat M, Hsing AY, Ma J, Danielpour D. Bcl-xL blocks transforming growth factor-beta 1-induced apoptosis by inhibiting cytochrome c release and not by directly antagonizing Apaf-1-dependent caspase activation in prostate epithelial cells. *J Biol Chem.* 2001;276:26614-21.
74. Conus S, Rosse T, Borner C. Failure of Bcl-2 family members to interact with Apaf-1 in normal and apoptotic cells. *Cell Death Differ.* 2000;7:947-54.
75. Newmeyer DD, Bossy-Wetzel E, Kluck RM, Wolf BB, Beere HM, Green DR. Bcl-xL does not inhibit the function of Apaf-1. *Cell Death Differ.* 2000;7:402-7.
76. Moriishi K, Huang DC, Cory S, Adams JM. Bcl-2 family members do not inhibit apoptosis by binding the caspase activator Apaf-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:9683-8.
77. Zhou BB, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature.* 2000;408:433-9.
78. Inohara N, Ekhterae D, Garcia I, Carrio R, Merino J, Merry A, Chen S, Nunez G. Mtd, a novel Bcl-2 family member activates apoptosis in the absence of heterodimerization with Bcl-2 and Bcl-XL. *J Biol Chem.* 1998;273:8705-10.
79. Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell.* 1995;80:285-91.
80. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell.* 1997;91:231-41.
81. del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R, Nunez G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science.* 1997;278:687-9.
82. Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α . *Curr Biol.* 1997;7:261-9.
83. Basu S, Bayoumy S, Zhang Y, Lozano J, Kolesnick R. BAD enables ceramide to signal apoptosis via Ras and Raf-1. *J Biol Chem.* 1998;273:30419-26.
84. Zundel W, Giaccia A. Inhibition of the anti-apoptotic PI(3)K/Akt/Bad pathway by stress. *Genes Dev.* 1998;12:1941-6.
85. Scheid MP, Duronio V. Dissociation of cytokine-induced phosphorylation of Bad and activation of PKB/akt: involvement of MEK upstream of Bad phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:7439-44.
86. Alessi DR, Cohen P. Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Curr Opin Genet Dev.* 1998;8:55-62.
87. Franke TF, Cantley LC. Apoptosis. A Bad kinase makes good. *Nature.* 1997;390:116-7.
88. Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell.* 1996;87:619-28.
89. O'Connor L, Strasser A, O'Reilly LA, Hausmann G, Adams JM, Cory S, Huang DC. Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *Embo J.* 1998;17:384-95.
90. Puthalakath H, Huang DC, O'Reilly LA, King SM, Strasser A. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell.* 1999;3:287-96.
91. Bouillet P, Metcalf D, Huang DC, Tarlinton DM, Kay TW, Kontgen F, Adams JM, Strasser A. Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science.* 1999;286:1735-8.
92. O'Reilly LA, Cullen L, Visvader J, Lindeman GJ, Print C, Bath ML, Huang DC, Strasser A. The proapoptotic BH3-only protein bim is expressed in hematopoietic, epithelial, neuronal, and germ cells. *Am*

- J Pathol. 2000;157:449-61.
93. Putcha GV, Moulder KL, Golden JP, Bouillet P, Adams JA, Strasser A, Johnson EM. Induction of BIM, a proapoptotic BH3-only BCL-2 family member, is critical for neuronal apoptosis. *Neuron*. 2001;29:615-28.
 94. Puthalakath H, Villunger A, O'Reilly LA, Beaumont JG, Coultas L, Cheney RE, Huang DC, Strasser A. Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science*. 2001;293:1829-32.
 95. Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*. 2000;288:1053-8.
 96. Nakano K, Wousden KH. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell*. 2001;7:683-94.
 97. Yu J, Zhang L, Hwang PM, Kinzler KW, Vogelstein B. PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell*. 2001;7:673-82.
 98. Sanz C, Benito A, Inohara N, Ekhterae D, Nunez G, Fernandez-Luna JL. Specific and rapid induction of the proapoptotic protein Hrk after growth factor withdrawal in hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 2000;95:2742-7.
 99. Inohara N, Ding L, Chen S, Nunez G. harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X(L). *Embo J*. 1997;16:1686-94.
 100. Wang K, Yin XM, Chao DT, Millman CL, Korsmeyer SJ. BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev*. 1996;10:2859-69.
 101. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*. 1998;94:481-90.
 102. Desagher S, Osen-Sand A, Nichols A, Eskes R, Montessuit S, Lauper S, Maundrell K, Antonsson B, Martinou JC. Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol*. 1999;144:891-901.
 103. Crompton M. Bax, Bid and the permeabilization of the mitochondrial outer membrane in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*. 2000;12:414-9.
 104. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*. 2001;292:727-30.
 105. Zong WX, Lindsten T, Ross AJ, MacGregor GR, Thompson CB. BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev*. 2001;15:1481-6.
 106. Zhivotovsky B, Samali A, Gahm A, Orrenius S. Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis. *Cell Death Differ*. 1999;6:644-51.
 107. Cheng EH, Kirsch DG, Clem RJ, Ravi R, Kastan MB, Bedi A, Ueno K, Hardwick JM. Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science*. 1997;278:1966-8.
 108. Tang D, Kidd VJ. Cleavage of DFF-45/ICAD by multiple caspases is essential for its function during apoptosis. *J Biol Chem*. 1998;273:28549-52.
 109. Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*. 1998;391:96-9.
 110. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*. 1998;391:43-50.
 111. Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*. 1980;284:555-6.
 112. Daniel PT, Sturm I, Ritschel S, Friedrich K, Dörken B, Bendzko P, Hillebrand T. Detection of genomic DNA fragmentation during apoptosis (DNA ladder) and the simultaneous isolation of RNA from low cell numbers. *Anal Biochem*. 1999;266:110-5.
 113. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*. 1994;84:1415-20.
 114. Wiegand UK, Corbach S, Prescott AR, Savill J, Spruce BA. The trigger to cell death determines the

- efficiency with which dying cells are cleared by neighbours. *Cell Death Differ.* 2001;8:734-46.
115. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature.* 2000;407:784-8.
 116. Samejima K, Tone S, Kottke TJ, Enari M, Sakahira H, Cooke CA, Durrieu F, Martins LM, Nagata S, Kaufmann SH, Earnshaw WC. Transition from caspase-dependent to caspase-independent mechanisms at the onset of apoptotic execution. *J Cell Biol.* 1998;143:225-39.
 117. Wyllie AH, Golstein P. More than one way to go. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:11-3.
 118. Gillett CE, Barnes DM. Demystified ... cell cycle. *Mol Pathol.* 1998;51:310-6.
 119. Donjerkovic D, Scott DW. Regulation of the G1 phase of the mammalian cell cycle. *Cell Res.* 2000;10:1-16.
 120. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 1999;13:1501-12.
 121. O'Connell MJ, Nurse P. How cells know they are in G1 or G2. *Curr Opin Cell Biol.* 1994;6:867-71.
 122. Doree M, Galas S. The cyclin-dependent protein kinases and the control of cell division. *Faseb J.* 1994;8:1114-21.
 123. Hunt T. Cyclins and their partners: from a simple idea to complicated reality. *Semin Cell Biol.* 1991;2:213-22.
 124. Stern B, Nurse P. A quantitative model for the cdc2 control of S phase and mitosis in fission yeast. *Trends Genet.* 1996;12:345-50.
 125. Kuntzel H, Schulz A, Ehbrecht IM. Cell cycle control and initiation of DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol Chem.* 1996;377:481-7.
 126. Lew DJ, Reed SI. Cell cycle control of morphogenesis in budding yeast. *Curr Opin Genet Dev.* 1995;5:17-23.
 127. Moser BA, Russell P. Cell cycle regulation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Opin Microbiol.* 2000;3:631-6.
 128. Johnson DG, Walker CL. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999;39:295-312.
 129. Hengstschlager M, Braun K, Soucek T, Miloloza A, Hengstschlager-Ottner E. Cyclin-dependent kinases at the G1-S transition of the mammalian cell cycle. *Mutat Res.* 1999;436:1-9.
 130. Li A, Blow JJ. The origin of CDK regulation. *Nat Cell Biol.* 2001;3:E182-4.
 131. Funk JO. Cancer cell cycle control. *Anticancer Res.* 1999;19:4772-80.
 132. Kasten MM, Giordano A. pRb and the cdks in apoptosis and the cell cycle. *Cell Death Differ.* 1998;5:132-40.
 133. King KL, Cidlowski JA. Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu Rev Physiol.* 1998;60:601-17.
 134. Blagosklonny MV. A node between proliferation, apoptosis, and growth arrest. *Bioessays.* 1999;21:704-9.
 135. Guo M, Hay BA. Cell proliferation and apoptosis. *Curr Opin Cell Biol.* 1999;11:745-52.
 136. Pucci B, Kasten M, Giordano A. Cell cycle and apoptosis. *Neoplasia.* 2000;2:291-9.
 137. Bartkova J, Lukas J, Bartek J. Aberrations of the G1- and G1/S-regulating genes in human cancer. *Prog Cell Cycle Res.* 1997;3:211-20.
 138. Del Sal G. The Mammalian cell cycle and its aberrations in cancer cells. *Adv Clin Path.* 1997;1:123-36.
 139. Donnellan R, Chetty R. Cyclin D1 and human neoplasia. *Mol Pathol.* 1998;51:1-7.
 140. Johnson DG, Schneider-Broussard R. Role of E2F in cell cycle control and cancer. *Front Biosci.* 1998;3:d447-8.
 141. Malumbres M, Pellicer A. RAS pathways to cell cycle control and cell transformation. *Front Biosci.* 1998;3:d887-912.
 142. Roussel MF. The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene.* 1999;18:5311-7.
 143. Mandard AM, Hainaut P, Hollstein M. Genetic steps in the development of squamous cell carcinoma of the esophagus. *Mutat Res.* 2000;462:335-42.
 144. Ekholm SV, Reed SI. Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Curr Opin*

- Cell Biol. 2000;12:676-84.
145. Vidal A, Koff A. Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene*. 2000;247:1-15.
 146. Shapiro GI, Harper JW. Anticancer drug targets: cell cycle and checkpoint control. *J Clin Invest*. 1999;104:1645-53.
 147. Meek DW. The role of p53 in the response to mitotic spindle damage. *Pathol Biol (Paris)*. 2000;48:246-54.
 148. Classon M, Dyson N. p107 and p130: versatile proteins with interesting pockets. *Exp Cell Res*. 2001;264:135-47.
 149. Bartek J, Lukas J. Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. *FEBS Lett*. 2001;490:117-22.
 150. Tamrakar S, Rubin E, Ludlow JW. Role of pRB dephosphorylation in cell cycle regulation. *Front Biosci*. 2000;5:D121-37.
 151. Kaelin WG, Jr. Functions of the retinoblastoma protein. *Bioessays*. 1999;21:950-8.
 152. Grana X, Garriga J, Mayol X. Role of the retinoblastoma protein family, pRB, p107 and p130 in the negative control of cell growth. *Oncogene*. 1998;17:3365-83.
 153. Yamasaki L. Balancing proliferation and apoptosis in vivo: the Goldilocks theory of E2F/DP action. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1423:M9-15.
 154. Amati B, Brooks MW, Levy N, Littlewood TD, Evan GI, Land H. Oncogenic activity of the c-Myc protein requires dimerization with Max. *Cell*. 1993;72:233-45.
 155. Amati B, Dalton S, Brooks MW, Littlewood TD, Evan GI, Land H. Transcriptional activation by the human c-Myc oncoprotein in yeast requires interaction with Max. *Nature*. 1992;359:423-6.
 156. Amati B, Littlewood TD, Evan GI, Land H. The c-Myc protein induces cell cycle progression and apoptosis through dimerization with Max. *Embo J*. 1993;12:5083-7.
 157. Warbrick E. PCNA binding through a conserved motif. *Bioessays*. 1998;20:195-9.
 158. Prosperi E. Multiple roles of the proliferating cell nuclear antigen: DNA replication, repair and cell cycle control. *Prog Cell Cycle Res*. 1997;3:193-210.
 159. Kerkhoff E, Rapp UR. Cell cycle targets of Ras/Raf signalling. *Oncogene*. 1998;17:1457-62.
 160. Hinz M, Krappmann D, Eichten A, Heder A, Scheidereit C, Strauss M. NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Mol Cell Biol*. 1999;19:2690-8.
 161. Delmer A, Ajchenbaum-Cymbalista F, Tang R, Ramond S, Faussat AM, Marie JP, Zittoun R. Overexpression of cyclin D2 in chronic B-cell malignancies. *Blood*. 1995;85:2870-6.
 162. Suzuki R, Kuroda H, Komatsu H, Hosokawa Y, Kagami Y, Ogura M, Nakamura S, Kodera Y, Morishima Y, Ueda R, Seto M. Selective usage of D-type cyclins in lymphoid malignancies. *Leukemia*. 1999;13:1335-42.
 163. Williams ME, Meeker TC, Swerdlow SH. Rearrangement of the chromosome 11 bcl-1 locus in centrocytic lymphoma: analysis with multiple breakpoint probes. *Blood*. 1991;78:493-8.
 164. Leonard JP, Schattner EJ, Coleman M. Biology and management of mantle cell lymphoma. *Curr Opin Oncol*. 2001;13:342-7.
 165. Panayiotidis P, Kotsi P. Genetics of small lymphocyte disorders. *Semin Hematol*. 1999;36:171-7.
 166. Vandenberghe E, De Wolf-Peters C, van den Oord J, Wlodarska I, Delabie J, Stul M, Thomas J, Michaux JL, Mecucci C, Cassiman JJ, et al. Translocation (11;14): a cytogenetic anomaly associated with B-cell lymphomas of non-follicle centre cell lineage. *J Pathol*. 1991;163:13-8.
 167. Keyomarsi K, Herliczek TW. The role of cyclin E in cell proliferation, development and cancer. *Prog Cell Cycle Res*. 1997;3:171-91.
 168. Schutte B, Ramaekers FC. Molecular switches that govern the balance between proliferation and apoptosis. *Prog Cell Cycle Res*. 2000;4:207-17.
 169. Peters JM. Subunits and substrates of the anaphase-promoting complex. *Exp Cell Res*. 1999;248:339-49.
 170. Cartwright P, Muller H, Wagener C, Holm K, Helin K. E2F-6: a novel member of the E2F family is an inhibitor of E2F- dependent transcription. *Oncogene*. 1998;17:611-23.

171. Muller H, Helin K. The E2F transcription factors: key regulators of cell proliferation. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1470:M1-12.
172. Muller H, Bracken AP, Vernell R, Moroni MC, Christians F, Grassilli E, Prosperini E, Vigo E, Oliner JD, Helin K. E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes Dev*. 2001;15:267-85.
173. Obaya AJ, Mateyak MK, Sedivy JM. Mysterious liaisons: the relationship between c-Myc and the cell cycle. *Oncogene*. 1999;18:2934-41.
174. Eisenman RN. Deconstructing myc. *Genes Dev*. 2001;15:2023-30.
175. Schuldiner O, Benvenisty N. A DNA microarray screen for genes involved in c-MYC and N-MYC oncogenesis in human tumors. *Oncogene*. 2001;20:4984-94.
176. Ben-Yosef T, Yanuka O, Halle D, Benvenisty N. Involvement of Myc targets in c-myc and N-myc induced human tumors. *Oncogene*. 1998;17:165-71.
177. Collier HA, Grandori C, Tamayo P, Colbert T, Lander ES, Eisenman RN, Golub TR. Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:3260-5.
178. Nesbit CE, Tersak JM, Prochownik EV. MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene*. 1999;18:3004-16.
179. Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS, Littlewood TD, Land H, Brooks M, Waters CM, Penn LZ, Hancock DC. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell*. 1992;69:119-28.
180. Hueber AO, Evan GI. Traps to catch unwary oncogenes. *Trends Genet*. 1998;14:364-7.
181. Fanidi A, Harrington EA, Evan GI. Cooperative interaction between c-myc and bcl-2 proto-oncogenes. *Nature*. 1992;359:554-6.
182. Serrano M. The INK4a/ARF locus in murine tumorigenesis. *Carcinogenesis*. 2000;21:865-9.
183. Sherr CJ, Weber JD. The ARF/p53 pathway. *Curr Opin Genet Dev*. 2000;10:94-9.
184. Lin AW, Lowe SW. Oncogenic ras activates the ARF-p53 pathway to suppress epithelial cell transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:5025-30.
185. Bargou RC, Wagener C, Bommert K, Arnold W, Daniel PT, Mapara MY, Grinstein E, Royer HD, Dörken B. Blocking the transcription factor E2F/DP by dominant-negative mutants in a normal breast epithelial cell line efficiently inhibits apoptosis and induces tumor growth in SCID mice. *J Exp Med*. 1996;183:1205-13.
186. Adams PD, Kaelin WG, Jr. The cellular effects of E2F overexpression. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1996;208:79-93.
187. Bergeron L, Yuan J. Sealing one's fate: control of cell death in neurons. *Curr Opin Neurobiol*. 1998;8:55-63.
188. Cory S, Vaux DL, Strasser A, Harris AW, Adams JM. Insights from Bcl-2 and Myc: malignancy involves abrogation of apoptosis as well as sustained proliferation. *Cancer Res*. 1999;59:1685s-92s.
189. Waldman T, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Uncoupling of S phase and mitosis induced by anticancer agents in cells lacking p21. *Nature*. 1996;381:713-6.
190. Sandig V, Brand K, Herwig S, Lukas J, Bartek J, Strauss M. Adenovirally transferred p16INK4/CDKN2 and p53 genes cooperate to induce apoptotic tumor cell death. *Nat Med*. 1997;3:313-9.
191. Naruse I, Heike Y, Hama S, Mori M, Saijo N. High concentrations of recombinant adenovirus expressing p16 gene induces apoptosis in lung cancer cell lines. *Anticancer Res*. 1998;18:4275-82.
192. Kadowaki Y, Fujiwara T, Fukazawa T, Shao J, Yasuda T, Itoshima T, Kagawa S, Hudson LG, Roth JA, Tanaka N. Induction of differentiation-dependent apoptosis in human esophageal squamous cell carcinoma by adenovirus-mediated p21sdi1 gene transfer. *Clin Cancer Res*. 1999;5:4233-41.
193. Katayose Y, Kim M, Rakkar AN, Li Z, Cowan KH, Seth P. Promoting apoptosis: a novel activity associated with the cyclin- dependent kinase inhibitor p27. *Cancer Res*. 1997;57:5441-5.
194. Russell P. Checkpoints on the road to mitosis. *Trends Biochem Sci*. 1998;23:399-402.
195. Cho RJ, Huang M, Campbell MJ, Dong H, Steinmetz L, Sapinoso L, Hampton G, Elledge SJ, Davis RW, Lockhart DJ. Transcriptional regulation and function during the human cell cycle. *Nat Genet*. 2001;27:48-54.

196. Cortez D, Elledge SJ. Conducting the mitotic symphony. *Nature*. 2000;406:354-6.
197. Lozano G, Elledge SJ. p53 sends nucleotides to repair DNA. *Nature*. 2000;404:24-5.
198. Sanchez Y, Elledge SJ. Stopped for repairs. *Bioessays*. 1995;17:545-8.
199. Lydall D, Weinert T. From DNA damage to cell cycle arrest and suicide: a budding yeast perspective. *Curr Opin Genet Dev*. 1996;6:4-11.
200. Boddy MN, Russell P. DNA replication checkpoint control. *Front Biosci*. 1999;4:D841-8.
201. Rhind N, Russell P. Mitotic DNA damage and replication checkpoints in yeast. *Curr Opin Cell Biol*. 1998;10:749-58.
202. Matsuoka S, Huang M, Elledge SJ. Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science*. 1998;282:1893-7.
203. Matsuoka S, Rotman G, Ogawa A, Shiloh Y, Tamai K, Elledge SJ. Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:10389-94.
204. Kastan MB, Lim DS. The many substrates and functions of ATM. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000;1:179-86.
205. Kim ST, Lim DS, Canman CE, Kastan MB. Substrate specificities and identification of putative substrates of ATM kinase family members. *J Biol Chem*. 1999;274:37538-43.
206. Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, Sedivy JM, Kinzler KW, Vogelstein B. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science*. 1998;282:1497-501.
207. el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*. 1993;75:817-25.
208. Harper JW, Elledge SJ, Keyomarsi K, Dynlacht B, Tsai LH, Zhang P, Dobrowolski S, Bai C, Connell-Crowley L, Swindell E, et al. Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol Biol Cell*. 1995;6:387-400.
209. Taylor WR, Stark GR. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*. 2001;20:1803-15.
210. Waldman T, Kinzler KW, Vogelstein B. p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res*. 1995;55:5187-90.
211. Wolf DA, Jackson PK. Cell cycle: oiling the gears of anaphase. *Curr Biol*. 1998;8:R636-9.
212. Zachariae W, Nasmyth K. Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes Dev*. 1999;13:2039-58.
213. Skibbens RV, Hieter P. Kinetochores and the checkpoint mechanism that monitors for defects in the chromosome segregation machinery. *Annu Rev Genet*. 1998;32:307-37.
214. Taylor SS, McKeon F. Kinetochore localization of murine Bub1 is required for normal mitotic timing and checkpoint response to spindle damage. *Cell*. 1997;89:727-35.
215. Taylor SS, Ha E, McKeon F. The human homologue of Bub3 is required for kinetochore localization of Bub1 and a Mad3/Bub1-related protein kinase. *J Cell Biol*. 1998;142:1-11.
216. Wang Y, Hu F, Elledge SJ. The Bfa1/Bub2 GAP complex comprises a universal checkpoint required to prevent mitotic exit. *Curr Biol*. 2000;10:1379-82.
217. Wood DA, Robbins GF, Zippin C, Lum D, Stearns M. Staging of cancer of the colon and cancer of the rectum. *Cancer*. 1979;43:961-8.
218. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguet H, Goasguen J, Vaugier G, Potron G, Colona P, Oberling F, Thomas M, Tchernia G, Jacquillat C, Boivin P, Lesty C, Duault MT, Monconduit M, Belabbes S, Gremy F. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. 1981;48:198-206.
219. Junker K. Prognostic factors in stage I/II non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2001;33 Suppl 1:S17-24.
220. Becker KF, Keller G, Hoefler H. The use of molecular biology in diagnosis and prognosis of gastric cancer. *Surg Oncol*. 2000;9:5-11.
221. Matutes E, Polliack A. Morphological and immunophenotypic features of chronic lymphocytic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol*. 2000;4:22-47.
222. Iqbal S, Lenz HJ. Determinants of prognosis and response to therapy in colorectal cancer. *Curr Oncol Rep*. 2001;3:102-8.

223. Hamilton A, Piccart M. The contribution of molecular markers to the prediction of response in the treatment of breast cancer: a review of the literature on HER-2, p53 and BCL-2. *Ann Oncol.* 2000;11:647-63.
224. Bradford CR. Predictive factors in head and neck cancer. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1999;13:777-85.
225. Serrone L, Hersey P. The chemoresistance of human malignant melanoma: an update. *Melanoma Res.* 1999;9:51-8.
226. Moul JW. Angiogenesis, p53, bcl-2 and Ki-67 in the progression of prostate cancer after radical prostatectomy. *Eur Urol.* 1999;35:399-407
227. Kusenda J. Bcl-2 family proteins and leukemia. *Neoplasma.* 1998;45:117-22
228. Gascoyne RD. Pathologic prognostic factors in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1997;11:847-62.
229. Gascoyne RD, Adomat SA, Krajewski S, Krajewska M, Horsman DE, Tolcher AW, O'Reilly SE, Hoskins P, Coldman AJ, Reed JC, Connors JM. Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood.* 1997;90:244-51.
230. Bordeleau L, Berinstein NL. Molecular diagnostics in follicular non-Hodgkin's lymphoma: a review. *Semin Oncol.* 2000;27:42-52.
231. Tsujimoto Y, Ikegaki N, Croce CM. Characterization of the protein product of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Oncogene.* 1987;2:3-7.
232. Tsujimoto Y, Croce CM. Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83:5214-8.
233. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science.* 1985;228:1440-3.
234. Hanada M, Delia D, Aiello A, Stadtmauer E, Reed JC. bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1993;82:1820-8.
235. Kitada S, Andersen J, Akar S, Zapata JM, Takayama S, Krajewski S, Wang HG, Zhang X, Bullrich F, Croce CM, Rai K, Hines J, Reed JC. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses. *Blood.* 1998;91:3379-89.
236. Raisova M, Hossini AM, Eberle J, Riebeling C, Wieder T, Sturm I, Daniel PT, Orfanos CE, Geilen CC. The Bax/Bcl-2 ratio determines the susceptibility of human melanoma cells to CD95/Fas-mediated apoptosis. *J Invest Dermatol.* 2001;117:333-40.
237. Prokop A, Wieder T, Sturm I, Essmann F, Seeger K, Wuchter C, Ludwig W-D, Henze G, Dörken B, Daniel PT. Relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia is associated with decrease of Bax/Bcl-2- ratio and loss of spontaneous caspase-3 processing in vivo. *Leukemia.* 2000;14:1606-13
238. Sturm I, Papadopoulos S, Hillebrand T, Benter T, Luck HJ, Wolff G, Dörken B, Daniel PT. Impaired BAX protein expression in breast cancer: mutational analysis of the BAX and the p53 gene. *Int J Cancer.* 2000;87:517-21.
239. Sturm I, Petrowsky H, Volz R, Lorenz M, Radetzki S, Hillebrand T, Wolff G, Hauptmann S, Dörken B, Daniel PT. Analysis of p53/BAX/p16ink4a/CDKN2 in esophageal squamous cell carcinoma: High BAX and p16ink4a/CDKN2 identifies patients with good prognosis. *J Clin Oncol.* 2001;19:2272-81
240. Yamamoto H, Sawai H, Perucho M. Frameshift somatic mutations in gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Cancer Res.* 1997;57:4420-6.
241. Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC, Perucho M. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science.* 1997;275:967-9.
242. Gutierrez MI, Cherney B, Hussain A, Mostowski H, Tosato G, Magrath I, Bhatia K. Bax is frequently compromised in Burkitt's lymphomas with irreversible resistance to Fas-induced apoptosis. *Cancer Res.* 1999;59:696-703.
243. Yamamoto H, Gil J, Schwartz S, Jr., Perucho M. Frameshift mutations in Fas, Apaf-1, and Bcl-10 in gastro-intestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Cell Death Differ.* 2000;7:238-9.
244. Soengas MS, Capodiceci P, Polsky D, Mora J, Esteller M, Opitz-Araya X, McCombie R, Herman JG, Gerald WL, Lazebnik YA, Cordon-Cardo C, Lowe SW. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature.* 2001;409:207-11.

245. Wolf BB, Schuler M, Li W, Eggers-Sedlet B, Lee W, Tailor P, Fitzgerald P, Mills GB, Green DR. Defective cytochrome c-dependent caspase activation in ovarian cancer cell lines due to diminished or absent apoptotic protease activating factor-1 activity. *J Biol Chem.* 2001;276:34244-51.
246. Ekert PG, Silke J, Hawkins CJ, Verhagen AM, Vaux DL. DIABLO promotes apoptosis by removing MIHA/XIAP from processed caspase 9. *J Cell Biol.* 2001;152:483-90.
247. Shi Y. A structural view of mitochondria-mediated apoptosis. *Nat Struct Biol.* 2001;8:394-401.
248. Srinivasula SM, Hegde R, Saleh A, Datta P, Shiozaki E, Chai J, Lee RA, Robbins PD, Fernandes-Alnemri T, Shi Y, Alnemri ES. A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature.* 2001;410:112-6.
249. Janicke RU, Sprengart ML, Wati MR, Porter AG. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem.* 1998;273:9357-60.
250. Friedrich K, Wieder T, Von Haefen C, Radetzki S, Janicke R, Schulze-Osthoff K, Dörken B, Daniel PT. Overexpression of caspase-3 restores sensitivity for drug-induced apoptosis in breast cancer cell lines with acquired drug resistance. *Oncogene.* 2001;20:2749-60.
251. Schwartz S, Jr., Yamamoto H, Navarro M, Maestro M, Reventos J, Perucho M. Frameshift mutations at mononucleotide repeats in caspase-5 and other target genes in endometrial and gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Cancer Res.* 1999;59:2995-3002.
252. Wang J, Zheng L, Lobito A, Chan FK, Dale J, Sneller M, Yao X, Puck JM, Straus SE, Lenardo MJ. Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell.* 1999;98:47-58.
253. Mullauer L, Gruber P, Sebinger D, Buch J, Wohlfart S, Chott A. Mutations in apoptosis genes: a pathogenetic factor for human disease. *Mutat Res.* 2001;488:211-31.
254. Jackson CE, Puck JM. Autoimmune lymphoproliferative syndrome, a disorder of apoptosis. *Curr Opin Pediatr.* 1999;11:521-7.
255. Martin DA, Zheng L, Siegel RM, Huang B, Fisher GH, Wang J, Jackson CE, Puck JM, Dale J, Straus SE, Peter ME, Krammer PH, Fesik S, Lenardo MJ. Defective CD95/APO-1/Fas signal complex formation in the human autoimmune lymphoproliferative syndrome, type Ia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:4552-7.
256. Teitz T, Lahti JM, Kidd VJ. Aggressive childhood neuroblastomas do not express caspase-8: an important component of programmed cell death. *J Mol Med.* 2001;79:428-36.
257. Teitz T, Wei T, Valentine MB, Vanin EF, Grenet J, Valentine VA, Behm FG, Look AT, Lahti JM, Kidd VJ. Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat Med.* 2000;6:529-35.
258. Wieder T, Essmann F, Prokop A, Schmelz K, Schulze-Osthoff K, Beyaert R, Dörken B, Daniel PT. Activation of Caspase-8 in drug-induced apoptosis of B-lymphoid cells is independent of CD95/Fas receptor ligand interaction and occurs downstream of Caspase-3. *Blood.* 2001;97:1378-87.
259. Bantel H, Engels IH, Voelter W, Schulze-Osthoff K, Wesselborg S. Mistletoe lectin activates caspase-8/FLICE independently of death receptor signaling and enhances anticancer drug-induced apoptosis. *Cancer Res.* 1999;59:2083-90.
260. Belka C, Rudner J, Wesselborg S, Stepczynska A, Marini P, Lepple-Wienhues A, Faltin H, Bamberg M, Budach W, Schulze-Osthoff K. Differential role of caspase-8 and BID activation during radiation- and CD95-induced apoptosis. *Oncogene.* 2000;19:1181-90.
261. Engels IH, Stepczynska A, Stroh C, Lauber K, Berg C, Schwenzer R, Wajant H, Janicke RU, Porter AG, Belka C, Gregor M, Schulze-Osthoff K, Wesselborg S. Caspase-8/FLICE functions as an executioner caspase in anticancer drug-induced apoptosis. *Oncogene.* 2000;19:4563-73.
262. Wesselborg S, Engels IH, Rossmann E, Los M, Schulze-Osthoff K. Anticancer drugs induce caspase-8/FLICE activation and apoptosis in the absence of CD95 receptor/ligand interaction. *Blood.* 1999;93:3053-63.
263. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell.* 1993;74:957-67.
264. Stewart ZA, Mays D, Pietsenpol JA. Defective G1-S cell cycle checkpoint function sensitizes cells to microtubule inhibitor-induced apoptosis. *Cancer Res.* 1999;59:3831-7.

265. Vihanskaya F, Vignati S, Beccaglia P, Ottoboni C, Russo P, D'Incalci M, Broggin M. Inactivation of p53 in a human ovarian cancer cell line increases the sensitivity to paclitaxel by inducing G2/M arrest and apoptosis. *Exp Cell Res.* 1998;241:96-101.
266. Debernardis D, Sire EG, De Feudis P, Vihanskaya F, Valenti M, Russo P, Parodi S, D'Incalci M, Broggin M. p53 status does not affect sensitivity of human ovarian cancer cell lines to paclitaxel. *Cancer Res.* 1997;57:870-4.
267. Hawkins DS, Demers GW, Galloway DA. Inactivation of p53 enhances sensitivity to multiple chemotherapeutic agents. *Cancer Res.* 1996;56:892-8.
268. Wahl AF, Donaldson KL, Fairchild C, Lee FY, Foster SA, Demers GW, Galloway DA. Loss of normal p53 function confers sensitization to Taxol by increasing G2/M arrest and apoptosis. *Nat Med.* 1996;2:72-9.
269. Woods CM, Zhu J, McQueney PA, Bollag D, Lazarides E. Taxol-induced mitotic block triggers rapid onset of a p53-independent apoptotic pathway. *Mol Med.* 1995;1:506-26.
270. Druker BJ, Lydon NB. Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *J Clin Invest.* 2000;105:3-7.
271. Mauro MJ, Druker BJ. STI571: a gene product-targeted therapy for leukemia. *Curr Oncol Rep.* 2001;3:223-7.
272. Stambolic V, Mak TW, Woodgett JR. Modulation of cellular apoptotic potential: contributions to oncogenesis. *Oncogene.* 1999;18:6094-103.
273. Crul M, de Klerk GJ, Beijnen JH, Schellens JH. Ras biochemistry and farnesyl transferase inhibitors: a literature survey. *Anticancer Drugs.* 2001;12:163-84.
274. Cohen LH, Pieterman E, van Leeuwen RE, Overhand M, Burm BE, van der Marel GA, van Boom JH. Inhibitors of prenylation of Ras and other G-proteins and their application as therapeutics. *Biochem Pharmacol.* 2000;60:1061-8.
275. Scharovsky OG, Rozados VR, Gervasoni SI, Matar P. Inhibition of ras oncogene: a novel approach to antineoplastic therapy. *J Biomed Sci.* 2000;7:292-8.
276. Hill BT, Perrin D, Kruczynski A. Inhibition of RAS-targeted prenylation: protein farnesyl transferase inhibitors revisited. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2000;33:7-23.
277. Zujewski J, Horak ID, Bol CJ, Woestenborghs R, Bowden C, End DW, Piotrovsky VK, Chiao J, Belly RT, Todd A, Kopp WC, Kohler DR, Chow C, Noone M, Hakim FT, Larkin G, Gress RE, Nussenblatt RB, Kremer AB, Cowan KH. Phase I and pharmacokinetic study of farnesyl protein transferase inhibitor R115777 in advanced cancer. *J Clin Oncol.* 2000;18:927-41.
278. End DW. Farnesyl protein transferase inhibitors and other therapies targeting the Ras signal transduction pathway. *Invest New Drugs.* 1999;17:241-58.
279. Hochhaus A, Kreil S, Corbin A, La Rosee P, Lahaye T, Berger U, Cross NC, Linkesch W, Druker BJ, Hehlmann R, Gambacorti- Passerini C, Corneo G, D'Incalci M. Roots of clinical resistance to STI-571 cancer therapy. *Science.* 2001;293:2163.
280. Gambacorti-Passerini C, Barni R, le Coutre P, Zucchetti M, Cabrita G, Cleris L, Rossi F, Gianazza E, Brueggen J, Cozens R, Pioltelli P, Pogliani E, Corneo G, Formelli F, D'Incalci M. Role of alpha1 acid glycoprotein in the in vivo resistance of human BCR- ABL(+) leukemic cells to the abl inhibitor STI571. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92:1641-50.
281. le Coutre P, Tassi E, Varella-Garcia M, Barni R, Mologni L, Cabrita G, Marchesi E, Supino R, Gambacorti-Passerini C. Induction of resistance to the Abelson inhibitor STI571 in human leukemic cells through gene amplification. *Blood.* 2000;95:1758-66.
282. Mahon FX, Deininger MW, Schultheis B, Chabrol J, Reiffers J, Goldman JM, Melo JV. Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood.* 2000;96:1070-9.
283. Senderowicz AM. Small molecule modulators of cyclin-dependent kinases for cancer therapy. *Oncogene.* 2000;19:6600-6.
284. Anderson NG, Ahmad T, Chan K, Dobson R, Bundred NJ. ZD1839 (Iressa), a novel epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor, potently inhibits the growth of EGFR- positive cancer cell lines with or without erbB2 overexpression. *Int J Cancer.* 2001;94:774-82.
285. Mendelsohn J, Baselga J. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene.* 2000;19:6550-

- 65.
286. Ciardiello F. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors as anticancer agents. *Drugs*. 2000;60:25-32; discussion 41-2.
287. Foster BA, Coffey HA, Morin MJ, Rastinejad F. Pharmacological rescue of mutant p53 conformation and function. *Science*. 1999;286:2507-10.
288. Banerjee D. Genasense (Genta Inc). *Curr Opin Investig Drugs*. 2001;2:574-80.
289. Jansen B, Wacheck V, Heere-Ress E, Schlagbauer-Wadl H, Hoeller C, Lucas T, Hoermann M, Hollenstein U, Wolff K, Pehamberger H. Chemosensitisation of malignant melanoma by BCL2 antisense therapy. *Lancet*. 2000;356:1728-33.
290. Klasa RJ, List AF, Cheson BD. Rational approaches to design of therapeutics targeting molecular markers. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*. 2001:443-62.
291. Maaser K, Hopfner M, Jansen A, Weisinger G, Gavish M, Kozikowski AP, Weizman A, Carayon P, Riecken EO, Zeitz M, Scherubl H. Specific ligands of the peripheral benzodiazepine receptor induce apoptosis and cell cycle arrest in human colorectal cancer cells. *Br J Cancer*. 2001;85:1771-80.
292. Bono F, Lamarche I, Prabonnaud V, Le Fur G, Herbert JM. Peripheral benzodiazepine receptor agonists exhibit potent antiapoptotic activities. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;265:457-61.
293. Enyedy IJ, Ling Y, Nacro K, Tomita Y, Wu X, Cao Y, Guo R, Li B, Zhu X, Huang Y, Long YQ, Roller PP, Yang D, Wang S. Discovery of Small-Molecule Inhibitors of Bcl-2 through Structure-Based Computer Screening. *J Med Chem*. 2001;44:4313-24.
294. Polster BM, Kinnally KW, Fiskum G. Bh3 death domain peptide induces cell type-selective mitochondrial outer membrane permeability. *J Biol Chem*. 2001;276:37887-94.
295. Finnegan NM, Curtin JF, Prevost G, Morgan B, Cotter TG. Induction of apoptosis in prostate carcinoma cells by BH3 peptides which inhibit Bak/Bcl-2 interactions. *Br J Cancer*. 2001;85:115-21.
296. Degterev A, Lugovskoy A, Cardone M, Mulley B, Wagner G, Mitchison T, Yuan J. Identification of small-molecule inhibitors of interaction between the BH3 domain and Bcl-xL. *Nat Cell Biol*. 2001;3:173-82.
297. Holinger EP, Chittenden T, Lutz RJ. Bak BH3 peptides antagonize Bcl-xL function and induce apoptosis through cytochrome c-independent activation of caspases. *J Biol Chem*. 1999;274:13298-304.
298. Daniel PT, Pun KT, Ritschel S, Sturm I, Holler J, Dörken B, Brown R. Expression of the death gene Bik/Nbk promotes sensitivity to drug-induced apoptosis in corticosteroid-resistant T-cell lymphoma and prevents tumor growth in severe combined immunodeficient mice. *Blood*. 1999;94:1100-7.
299. Radetzki S, Köhne CH, von Haefen C, Gillissen B, Sturm I, Dörken B, Daniel PT. The apoptosis promoting Bcl-2 homologues Bak and Nbk/Bik overcome drug resistance in Mdr-1-negative and Mdr-1 overexpressing breast cancer cell lines. *Oncogene*. 2001;in press.

Anhang

Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten

1. Radetzki S, Köhne CH, von Haefen C, Gillissen B, Sturm I, Dörken B, Daniel PT. The apoptosis promoting Bcl-2 homologues Bak and Nbk/Bik overcome drug resistance in Mdr-1-negative and Mdr-1 overexpressing breast cancer cell lines. *Oncogene*. 2002;in press
2. Bosanquet, Sturm I, Wieder T, Essmann F, Bosanquet MI, Head DJ, Dörken B, Daniel PT. Bax-Expression correlates with cellular drug sensitivity to doxorubicin, cyclophosphamide and chlorambucil but not fludarabine, cladribine or corticosteroids in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2002;15:in press
3. Wieder T, Prokop A, Bagci B, Essmann F, Bernicke D, Schulze-Osthoff K, Dörken B, Schmalz HG, Daniel PT, Henze G. Piceatannol, a hydroxylated analog of the chemopreventive agent resveratrol, is a potent inducer of apoptosis in the lymphoma cell line BJAB and in primary, leukemic lymphoblasts. *Leukemia*. 2001;15:1735-42
4. Wieder T, Essmann F, Prokop A, Schmelz K, Schulze-Osthoff K, Beyaert R, Dörken B, Daniel PT. Activation of Caspase-8 in drug-induced apoptosis of B-lymphoid cells is independent of CD95/Fas receptor ligand interaction and occurs downstream of Caspase-3. *Blood*. 2001;97:1378-87
5. Sturm I, Petrowsky H, Volz R, Lorenz M, Radetzki S, Hillebrand T, Wolff G, Hauptmann S, Dörken B, Daniel PT. Analysis of p53/BAX/p16ink4a/CDKN2 in esophageal squamous cell carcinoma: High BAX and p16ink4a/CDKN2 identifies patients with good prognosis. *J Clin Oncol*. 2001;19:2272-81
6. Raisova M, Hossini A, Eberle J, Riebeling C, Wieder T, Sturm I, Daniel PT, Orfanos CE, Geilen CC. The Bax/Bcl-2 ratio determines the susceptibility of human melanoma cells to CD95/Fas-mediated apoptosis. *J Invest Dermatol*. 2001;177:333-40
7. Petrowsky H, Sturm I, Graubitz O, Kooby DA, Staib-Sebler E, Gog C, Köhne C-H, Hillebrand T, Daniel PT, Fong Y, Lorenz M. Relevance of Ki-67 antigen expression and K-ras mutation in colorectal liver metastases. *Eur J Surg Oncol*. 2001;27:80-7
8. Hermann S, Sturm I, Mrozek A, Klosterhalfen B, Hauptmann S, Dörken B, Daniel PT. Bax-Expression in benign and malignant thyroid tumors: Dysregulation of wild type p53 is associated with a high BAX and p21 expression in thyroid carcinoma. *Int J Cancer*. 2001;92:805-11
9. Friedrich K, Wieder T, von Haefen C, Radetzki S, Schulze-Osthoff K, Jänicke R, Dörken B, Daniel PT. Overexpression of caspase-3 restores sensitivity for drug-induced apoptosis in breast cancer cells with acquired drug resistance. *Oncogene*. 2001;20:2749-460
10. Sturm I, Papadopoulos S, Hillebrand T, Benter T, Lück H-J, Wolff G, Dörken B, Daniel PT. Impaired BAX protein expression in breast cancer: mutational analysis of the BAX and the p53 gene. *Int J Cancer*. 2000;87:517-21
11. Raisova M, Bektas M, Wieder T, Daniel P, Eberle J, Orfanos CE, Geilen CC. Resistance to CD95/Fas-induced and ceramide-mediated apoptosis of human melanoma cells is caused by a defective mitochondrial cytochrome c release. *FEBS Lett*. 2000;473:27-32
12. Prokop A, Wieder T, Sturm I, Essmann F, Seeger K, Wuchter C, Ludwig W-D, Henze G, Dörken B, Daniel PT. Relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia is associated with decrease of Bax/Bcl-2- ratio and loss of spontaneous caspase-3 processing in vivo. *Leukemia*. 2000;14:1606-13
13. Löffler A, Kufer P, Lutterbuse R, Zettl F, Daniel PT, Schwenkenbecher JM, Riethmüller G, Dörken B, Bargou RC. A recombinant bispecific single-chain antibody, CD19 x CD3, induces rapid and high lymphoma-directed cytotoxicity by unstimulated T lymphocytes. *Blood*. 2000;95:2098-103.
14. Essmann F, Wieder T, Otto A, Müller EC, Dörken B, Daniel PT. GDP dissociation inhibitor D4-GDI (Rho-

- GDI 2), but not the homologous rho-GDI 1, is cleaved by caspase-3 during drug-induced apoptosis. *Biochem J.* 2000;346:777-83
15. Sturm I, Kohne CH, Wolff G, Petrowsky H, Hillebrand T, Hauptmann S, Lorenz M, Dörken B, Daniel PT. Analysis of the p53/BAX pathway in colorectal cancer: low BAX is a negative prognostic factor in patients with resected liver metastases. *J Clin Oncol.* 1999;17:1364-74
 16. Daniel PT, Sturm I, Ritschel S, Friedrich K, Dörken B, Bendzko P, Hillebrand T. Detection of genomic DNA fragmentation during apoptosis (DNA ladder) and the simultaneous isolation of RNA from low cell numbers. *Anal Biochem.* 1999;266:110-5
 17. Daniel PT, Scholz C, Essmann F, Westermann J, Pezzutto A, Dörken B. CD95/Fas-triggered apoptosis of activated T lymphocytes is prevented by dendritic cells through a CD58-dependent mechanism. *Exp Hematol.* 1999;27:1402-8
 18. Daniel PT, Pun KT, Ritschel S, Sturm I, Holler J, Dörken B, Brown R. Expression of the death gene Bik/Nbk promotes sensitivity to drug-induced apoptosis in corticosteroid-resistant T-cell lymphoma and prevents tumor growth in severe combined immunodeficient mice. *Blood.* 1999;94:1100-7
 19. Köhne CH, Thuss-Patience P, Friedrich M, Daniel PT, Kretzschmar A, Benter T, Bauer B, Dietz R, Dörken B. Raltitrexed (Tomudex): an alternative drug for patients with colorectal cancer and 5-fluorouracil associated cardiotoxicity. *Br J Cancer.* 1998;77:973-7
 20. Daniel PT, Kroidl A, Kopp J, Sturm I, Moldenhauer G, Dörken B, Pezzutto A. Immunotherapy of B-cell lymphoma with CD3x19 bispecific antibodies: costimulation via CD28 prevents "veto" apoptosis of antibody-targeted cytotoxic T cells. *Blood.* 1998;92:4750-7
 21. Daniel PT, Oettinger U, Mapara MY, Bommert K, Bargou R, Dörken B. Activation and activation-induced death of human tonsillar B cells and Burkitt lymphoma cells: lack of CD95 (Fas/APO-1) ligand expression and function. *Eur J Immunol.* 1997;27:1029-34
 22. Daniel PT, Kroidl A, Cayeux S, Bargou R, Blankenstein T, Dörken B. Costimulatory signals through B7.1/CD28 prevent T cell apoptosis during target cell lysis. *J Immunol.* 1997;159:3808-15
 23. Wagener C, Bargou RC, Daniel PT, Bommert K, Mapara MY, Royer HD, Dörken B. Induction of the death-promoting gene bax-alpha sensitizes cultured breast-cancer cells to drug-induced apoptosis. *Int J Cancer.* 1996;67:138-41
 24. Bargou RC, Wagener C, Bommert K, Mapara MY, Daniel PT, Arnold W, Dietel M, Guski H, Feller A, Royer HD, Dörken B. Overexpression of the death-promoting gene bax-alpha which is downregulated in breast cancer restores sensitivity to different apoptotic stimuli and reduces tumor growth in SCID mice. *J Clin Invest.* 1996;97:2651-9
 25. Bargou RC, Wagener C, Bommert K, Arnold W, Daniel PT, Mapara MY, Grinstein E, Royer HD, Dörken B. Blocking the transcription factor E2F/DP by dominant-negative mutants in a normal breast epithelial cell line efficiently inhibits apoptosis and induces tumor growth in SCID mice. *J Exp Med.* 1996;183:1205-13
 26. Mapara MY, Weinmann P, Bommert K, Daniel PT, Bargou R, Dörken B. Involvement of NAK-1, the human nur77 homologue, in surface IgM- mediated apoptosis in Burkitt lymphoma cell line BL41. *Eur J Immunol.* 1995;25:2506-10
 27. Lagresle C, Bella C, Daniel PT, Krammer PH, Defrance T. Regulation of germinal center B cell differentiation. Role of the human APO-1/Fas (CD95) molecule. *J Immunol.* 1995;154:5746-56
 28. Chlichlia K, Moldenhauer G, Daniel PT, Busslinger M, Gazzolo L, Schirmacher V, Khazaie K. Immediate effects of reversible HTLV-1 tax function: T-cell activation and apoptosis. *Oncogene.* 1995;10:269-77
 29. Blase L, Daniel PT, Koretz K, Schwartz-Albiez R, Moller P. The capacity of human malignant B-lymphocytes to disseminate in SCID mice is correlated with functional expression of the fibronectin receptor alpha 5 beta 1 (CD49e/CD29). *Int J Cancer.* 1995;60:860-6
 30. Bargou RC, Daniel PT, Mapara MY, Bommert K, Wagener C, Kallinich B, Royer HD, Dörken B. Expression of the bcl-2 gene family in normal and malignant breast tissue: low bax-alpha expression in tumor cells correlates with resistance towards apoptosis. *Int J Cancer.* 1995;60:854-9
 31. Bargou RC, Bommert K, Weinmann P, Daniel PT, Wagener C, Mapara MY, Dörken B. Induction of Bax-alpha precedes apoptosis in a human B lymphoma cell line: potential role of the bcl-2 gene family in surface IgM-mediated apoptosis. *Eur J Immunol.* 1995;25:770-5
 32. Lucking-Famira KM, Daniel PT, Moller P, Krammer PH, Debatin KM. APO-1 (CD95) mediated apoptosis in human T-ALL engrafted in SCID mice. *Leukemia.* 1994;8:1825-33

33. Daniel PT, Krammer PH. Activation induces sensitivity toward APO-1 (CD95)-mediated apoptosis in human B cells. *J Immunol.* 1994;152:5624-32
34. Coney LR, Daniel PT, Sanborn D, Dhein J, Debatin KM, Krammer PH, Zurawski VR, Jr. Apoptotic cell death induced by a mouse-human anti-APO-1 chimeric antibody leads to tumor regression. *Int J Cancer.* 1994;58:562-7
35. Bargou RC, Mapara MY, Zugck C, Daniel PT, Pawlita M, Dohner H, Dörken B. Characterization of a novel Hodgkin cell line, HD-MyZ, with myelomonocytic features mimicking Hodgkin's disease in severe combined immunodeficient mice. *J Exp Med.* 1993;177:1257-68
36. Dhein J, Daniel PT, Trauth BC, Oehm A, Moller P, Krammer PH. Induction of apoptosis by monoclonal antibody anti-APO-1 class switch variants is dependent on cross-linking of APO-1 cell surface antigens. *J Immunol.* 1992;149:3166-73
37. Daniel PT, Holzschuh J, Berg PA. Sulfadoxine specific lymphocyte transformation in a patient with eosinophilic pneumonia induced by sulfadoxine-pyrimethamine (Fansidar). *Thorax.* 1989;44:307-9
38. Daniel PT, Holzschuh J, Berg PA. The pathogenesis of cianidanol-induced fever. *Eur J Clin Pharmacol.* 1988;34:241-7
39. Berg PA, Holzschuh J, Daniel PT, Becker EW, Jedrychowski A. Cefotaxime-induced allergic agranulocytosis in an acute attack of serologically atypical primary biliary cirrhosis. *Dtsch Med Wochenschr.* 1988;113:1478-81
40. Saal JG, Daniel PT, Berg PA. Indoprofen-induced aplastic anemia in active connective tissue disease detected by drug-specific lymphocyte transformation. *Klin Wochenschr.* 1986;64:481-5

Übersichtsarbeiten, Buchbeiträge

1. Daniel PT, Sturm I, Wieder T, Schulze-Osthoff K. The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. *Leukemia.* 2001;15:1022-32
2. Daniel PT. Dissecting the pathways to death. *Leukemia.* 2000;14:2035-44
3. Daniel PT, Dörken B. Natural born killers. Selbstmord Programme von Zellen liefern neue Ansätze für die Krebstherapie. *Humboldt Spektrum.* 2000;7:4-8
4. Daniel PT, Pezzutto A, Dörken B. Humoral immunotherapy and the use of monoclonal antibodies. In: *Textbook of Malignant Haematology*, ed. by Degos, I., Linch, D. C., and Löwenberg, B., Martin Dunitz Ltd., London. 1999:425-46
5. Köhne CH, Daniel PT, Dörken B. The value of weekly high dose infusional 5-fluorouracil in the treatment of advanced colorectal cancer. *Tumori.* 1997;83:S56-60
6. Krammer PH, Behrmann I, Daniel P, Dhein J, Debatin KM. Regulation of apoptosis in the immune system. *Curr Opin Immunol.* 1994;6:279-89
7. Krammer PH, Dhein J, Walczak H, Behrmann I, Mariani S, Matiba B, Fath M, Daniel PT, Knipping E, Westendorp MO, Stricker K, Bäumler C, Hellbardt S, Germer M, Peter ME, Debatin KM. The role of APO-1-mediated apoptosis in the immune system. *Immunol Rev.* 1994;142:175-91
8. Dhein J, Behrmann I, Daniel PT, Debatin KM, Klas C, Moller P, Oehm A, Trauth BC, Walczak H, Krammer PH. APO-I-mediated apoptosis in normal and malignant lymphocytes. *Biochem Soc Trans.* 1994;22:598-600
9. Berg PA, Daniel P, Holzschuh J. Immunsystem. In: *Pathophysiologie des Menschen*. Ed: K. Hierholzer, R. F. Schmidt, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim. 1991:2.1-2.30
10. Krammer PH, Behrmann I, Bier V, Daniel P, Dhein J, Falk MH, Garcin G, Klas C, Knipping E, Lücking-Famira KM, Matzku S, Oehm A, Richards S, Trauth BC, Bornkamm GW, Falk W, Möller P, Debatin K-M. Apoptosis in the APO-1 system. In: F. Cope and D. Tomei (eds.), *Apoptosis: the molecular basis of cell death*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1991:87-99
11. Berg PA, Daniel PT. Co-trimoxazole-induced hepatic injury--an analysis of cases with hypersensitivity-like reactions. *Infection.* 1987;15 Suppl 5:S259-64
12. Berg PA, Daniel PT, Brattig N. Immunologie und Nachweis medikamentöser Allergien. In: *Manuale*

- allergologicum. Ed: E. F. Fuchs und K. H. Schulz, Dustri Verlag, Deisenhofen. 1987;IV.11.1-3
13. Berg PA, Daniel PT, Holzschuh J, Brattig N. Drug hypersensitivity. Diagnosis and immunopathogenesis. Dtsch Med Wochenschr. 1987;113:65-73

Kongresspublikationen, Letters to the Editor

1. Daniel PT, Sturm I, Wolff G, Petrowsky H, Köhne CH, Hillebrand T, Dörken B, Lorenz M. Analysis of the p53/BAX pathway: Low Bax-Expression is a negative prognostic factor in patients with resected liver metastases of colorectal adenocarcinoma. Langenbecks Arch Chir. 1999;Suppl. 1:163-9
2. Daniel PT, Kroidl A, Cayeux S, Scholz C, Sturm I, Blankenstein T, Pezzutto A, Dörken B. Retroviral B7.1 gene transfer in cancer cells protects cytotoxic T cells from deletion by "veto" apoptosis. Adv Exp Med Biol. 1998;451:265-76
3. Daniel PT, Scholz C, Westermann J, Dörken B, Pezzutto A. Dendritic cells prevent CD95 mediated T lymphocyte death through costimulatory signals. Adv Exp Med Biol. 1998;451:173-7
4. Koehne CH, Daniel P. Autologous bone marrow transplantation in relapsed non-Hodgkin's lymphoma [letter; comment]. N Engl J Med. 1996;334:990-1; discussion 1-2
5. Daniel PT, Holzschuh J, Muller CE, Roth HJ, Berg PA. Inhibition of phytohemagglutinine-induced T lymphocyte proliferation by 6-(octadecyldithio)purine, a novel liposomal prodrug of 6- mercaptopurine. Arch Toxicol Suppl. 1989;13:179-82
6. Berg PA, Daniel PT. Effects of flavonoid compounds on the immune response. Prog Clin Biol Res. 1988;280:157-71
7. Daniel PT, Holzschuh J, Diao GJ, Berg PA. Interference of the flavonoid compound cianidanol with macrophage function and lymphocyte activating mechanisms. Prog Clin Biol Res. 1988;280:205-9
8. Daniel PT, Falcioni F, Berg AU, Berg PA. Influence of cianidanol on specific and non-specific immune mechanisms. Methods Find Exp Clin Pharmacol. 1986;8:139-45
9. Saal JG, Daniel PT, Berg PA, Waller HD. Indoprofen-induced aplastic anaemia in systemic lupus, diagnosed by lymphocyte transformation tests [letter]. Lancet. 1985;1:1450-1

Eidestattliche Versicherung

gemäß Habilitationsordnung der Charité

Hiermit erkläre ich, daß keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren anhängig sind, weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde, die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind und mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist,

gez. Dr. P. Daniel

Berlin, den 1.1.2002